

Formstabile Peptidepitope für die personalisierte Diagnostik der rheumatoiden Arthritis

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
ANDREAS SCHRIMPF, M.Sc.
aus Fulda

Marburg/Lahn 2018

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 26.01.2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Armin Geyer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Eric Meggers

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2018

Hochschulkennziffer: 1180

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2014 bis Oktober 2017 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Armin Geyer

für die große wissenschaftliche Freiheit und die Unterstützung und Hilfestellung bei der Bearbeitung dieser vielseitigen und komplexen Thematik.

Kurzzusammenfassung

Die molekularen Grundlagen der Autoimmunität wurden mit Hilfe von Filaggrin-abgeleiteten β -*hairpin*-Peptiden erforscht. Als Modellerkrankung diente die rheumatoide Arthritis (RA), in deren Krankheitsverlauf sich eine Vielzahl von Autoantikörpersubtypen ausbildet. Es wurden Antworten auf die Frage gefunden, welche Eigenschaften Peptide besitzen müssen, um überhaupt als Epitope erkannt zu werden und somit die vorgenannten Subtypen zu binden und letztendlich zu unterscheiden. Die mittels Festphasensynthese hergestellten Peptidepitope eignen sich gleichzeitig als diagnostische Werkzeuge für die frühzeitige serologische Erkennung von RA. Ihr konformationeller Raum wurde systematisch durch korrelierte Einführung von β -*hairpin*-Designelementen (hydrophober Cluster, D-Aminosäuren, Disulfide, Deletionen etc.) variiert und mittels NMR-Spektroskopie in Lösung detailliert analysiert. Die daraus hervorgehenden, ungewöhnlichen Peptidstrukturen wurden in ELISA-Tests auf ihre biologische Aktivität gegenüber kommerziell erhältlichen RA-Autoantikörpern untersucht. Auf dieser Basis wurde eine Vorauswahl getroffen, um ein Set von zueinander komplementären Peptidantigenen (sowohl in Bezug auf ihre Konformation als auch auf ihre Antikörperaffinität) in weiterführenden Assays gegen Blutseren zu verwenden. Für jeden Patienten wurde so ein Barcode an gemessenen Absorptionen im ELISA erhalten, die je nach Kombination an absoluten und relativen Affinitäten der verwendeten Antigene zur (indirekten) Identifikation von Autoantikörper-Profilen führen. Diese ersten Tests liefern einen wichtigen Beitrag zu einer personalisierten Diagnostik der RA, wobei die angewendeten Methodiken auf andere Autoimmunerkrankungen und deren Epitop-Paratop-Paare übertragbar sind.

Durch Deletion von Aminosäurepaaren der β -*hairpin*-Peptide wurden nicht nur hochaktive dimere Epitope erhalten, sondern es konnten auch Aussagen über die Periodizität dieser Sekundärstruktur gewonnen werden. Dabei wurde regioselektiv ein disulfidreiches (jede dritte Aminosäure des 12er-*hairpins* ist ein Cystein), antiparalleles *hinge*-Dimer (engl. *hinge*: Scharnier) mit vier Disulfidbrücken synthetisiert, das ohne den aufwendigen Einsatz von orthogonalen Schutzgruppen zuverlässig Homodimere ausbildet. Diese Peptidsequenz konnte in einem *bottom up*-Ansatz als Dimerisierungsdomäne in Proteine und Antikörper (letztere enthalten in ihrer natürlichen Form parallele *hinge*-Regionen) mittels rekombinanter Methoden eingebracht werden.

Diese Arbeit liefert also entscheidende Beiträge zur Synthese und Strukturaufklärung von β -*hairpin*-Epitopen, zu deren systematischer Variation sowie deren Einsatz in der personalisierten Autoimmundiagnostik. Darüber hinaus wurden auf diese Weise verlässlich faltende Dimerisierungsdomänen für das *de novo*-Design von Proteinen erstellt.

Abstract

The molecular basis of autoimmunity was researched by utilising filaggrin derived β -hairpin peptides. Rheumatoid arthritis (RA) served as a role model. During its disease course, a wide variety of autoantibody subtypes emerges. In this context, answers to the question have been found, what actually makes a peptide an epitope, that is able to bind the aforementioned subtypes and ultimately distinguish them. Such peptide epitopes were synthesised via solid phase peptide synthesis and could be used as diagnostic tools for the early identification of rheumatoid arthritis (RA). Their conformational space was systematically varied by the correlated introduction of β -hairpin design elements (hydrophobic cluster, D-amino acids, disulfides, deletions etc.) and investigated in detail by NMR spectroscopy. The peptides' diverse, unusual conformations and dynamics were then correlated with their biological activity against commercially available RA autoantibodies in ELISA tests. Based on these, a preselection of mutually complementary peptide antigens (regarding their conformation as well as their antibody affinities) were utilised in consecutive assays against blood sera. A barcode of measured absorptions in ELISA was thus obtained for every RA patient, which led to (indirect) identification of autoantibody profiles depending on the combinations of absolute and relative intensities among the employed antigens. These first tests deliver an important contribution towards a personalised RA diagnosis. At the same time, all applied methodologies can be transferred to other autoimmune diseases and their associated paratope-epitope-pairs.

The deletion of amino acid pairs from the β -hairpin peptides did not only lead to highly affine epitopes, but also to valuable insights into the periodicity of this secondary structure. In this context, a disulfide-rich (every third amino acid of the 12mer hairpin constitutes a cysteine), antiparallel hinge peptide could be synthesised without elaborate protecting group chemistry. In a seminal bottom up approach, this biomolecule served as dimerisation domain in proteins and antibodies (the latter contain a parallel hinge region in their native state) by means of recombinatorial methods.

This thesis provides a decisive contribution to the design, preparation and structural characterisation of β -hairpin peptide epitopes, their systematic and broadly applicable synthetic variation as well as their utilisation in autoimmune diagnostics. Beyond that, a reliably folding dimerisation domain has been created for the *de novo* design of proteins.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- **Andreas Schrimpf**, Armin Geyer:

Two opposing D-amino acids give zigzag hairpin epitopes an additional kink to create antibody-selective peptide antigens.

ChemBioChem **2016**, 17, 2129–2132.

DOI: 10.1002/cbic.201600479

- **Andreas Schrimpf**, Armin Geyer

Constricted peptidic epitopes for the personalised diagnosis of rheumatoid arthritis

in *Proceedings of the 34th European Peptide Symposium*, European Peptide Society, Leipzig **2016**, S. 117.

- **Andreas Schrimpf**, Uwe Linne, Armin Geyer:

Eight at one stroke - a synthetic tetra-disulfide peptide epitope

Organic and Biomolecular Chemistry **2017**, 15, 2512-2521.

DOI: 10.1039/c6ob02746f

Was dem Schwarm nicht nützt, das nützt auch der einzelnen Biene nicht.

MARCUS AURELIUS

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Peptidepitope.....	2
1.2	<i>Hairpins</i> als Peptidepitope - Design und Stabilität	4
1.2.1	Die intrinsische Dynamik von β - <i>hairpin</i> -Peptiden	8
1.3	Autoimmunepitope - Fremd und Selbst	9
1.3.1	Synthetische Peptidepitope als diagnostische Werkzeuge	10
1.4	Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	12
1.4.1	Die serologische Diagnostik der rheumatoiden Arthritis	15
1.5	D-Aminosäuren in Peptiden - Die Erweiterung des Alphabets	18
1.6	Disulfidreiche Peptide	22
1.6.1	Synthesemethoden für disulfidreiche Peptide	24
1.6.2	Disulfidreiche Dimere	27
1.7	Antikörper und ihre Dynamik	29
1.7.1	Die Antikörper- <i>hinge</i> -Region	32
1.8	Multiple Antigenpeptide	33
1.9	Scanmethoden für Peptide.....	35
1.10	Strukturaufklärung von Peptiden mittels NMR-Spektroskopie	36
2.	Aufgabenstellung	41
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	45
3.1	Wann ist ein Peptid ein Epitop?	45
3.2	Synthese der Peptidepitope	46
3.3	Formstabilität - Methodik der Strukturaufklärung	47
3.3.1	Seitenkettenrotamere	53
3.3.2	Die Tryptophan-Seitenkette im hydrophoben Cluster	58

3.4	ELISA-Tests und deren Optimierung	59
3.4.1	Arginin oder Citrullin? Die Validität der ELISA-Tests	63
3.5	Paarweise korrelierte D-Aminosäuren.....	64
3.5.1	Detaillierte Konformationsanalyse der Mono- und Doppel-D-Peptide	69
3.5.2	Biologische Aktivität und antikörperselektive Antigene	75
3.5.3	Weitere Doppel-D-Peptide - Doppel-D-Scan.....	76
3.5.4	Ein all-D-Peptid epitop	78
3.6	Modulkombination: D-Aminosäuren und Disulfide.....	79
3.6.1	Konformationsanalyse der Bidisulfid-Epitope	84
3.6.2	ELISA-Tests der Bidisulfide	88
3.7	Epitopgröße und <i>hairpin</i> -Periodizität	89
3.8	Acht auf einen Streich - Disulfidreiche Epitop-Dimere und -Monomere.....	94
3.8.1	Konformationelle Analyse der Monomere und Dimere.....	97
3.8.2	Ionenmobilitätsspektrometrie	107
3.8.3	Temperaturabhängige CD-Spektroskopie des Tetradisulfid-Dimers	108
3.8.4	Heterodimere - Korrelierte Bewegungen	109
3.8.5	Die Komplexität einer fehlgeschlagenen Cystein-Oxidation.....	111
3.8.6	N- und C-terminale Variation des dimeren Tetradisulfid-Motivs.....	112
3.8.7	Variation des <i>turns</i> im 12er- <i>hairpin</i>	115
3.9	Das Tetradisulfid als Dimerisierungsdomäne in Proteinstrukturen	117
3.9.1	LEH-Dimere.....	118
3.9.2	Eine antiparallele <i>hinge</i> -Region in Antikörpern	122
3.10	Die Rolle des Tryptophans im hydrophoben Cluster	124
3.10.1	Fluoreszenzspektroskopie	127
3.11	Filaggrin-Foldon-Epitopchimären: Eine funktionelle Rekonstruktion	129
3.12	Die Nachbarn des Citrullin	137
3.13	<i>Turn</i> -Geometrie.....	140

3.14	Die Seitenkettenlänge des Haptens - Homologe des Citrullins	144
3.15	Ansätze zu einer personalisierten RA-Diagnostik	148
3.15.1	Auswahl der Peptidepitope für ELISA-Tests mit Blutseren	152
3.15.2	ELISA-Tests mit Blutseren	155
3.15.3	Der Ethikantrag	159
3.16	Weitere <i>hairpin</i> -Designelemente	160
3.16.1	Korrelierte β -Aminosäuren	160
3.16.2	Ribopyranosylierte Filaggrin-Peptide	163
3.16.3	Hot=Tap als β -turn-Mimetikum.....	164
3.16.4	Die Position 4 im hydrophoben Cluster - Ladungsmuster	165
3.17	Wann ist ein Peptid ein Epitop? <i>Revisited</i>	168
4.	Zusammenfassung	173
4.1	Conclusion	177
5.	Ausblick	181
6.	Experimenteller Teil.....	183
6.1	Allgemeine Anmerkungen	183
6.2	Peptidsynthese.....	187
6.3	ELISA	189
6.4	Molekulardynamik-Simulation	190
6.5	Analytische Daten der synthetisierten Peptide.....	190
6.6	Synthese der Aminosäurebausteine.....	300
7.	Quellenverzeichnis	305
8.	Anhang	323
8.1	Seitenkettenrotamere des Referenzpeptids 1	323
8.2	<i>Turn</i> -NOE-Kontakte	332
8.3	Alkylierung und anschließender Trypsinverdau von Tetrathiolsequenz 22	334
8.4	Massenspektren der Monomere und Dimere aus 12er-Sequenzen	339

8.5	Konzentrationsabhängige Dimerisierung der Tetrathiolsequenz 28	342
8.6	Massenspektren des Trypsinverdaus der Dimere 24d und 28d.....	343
8.7	NMR-Spektren des Tetradisulfids 28d	349
8.8	Ionenmobilitätsspektrometrie der 12er-Monomere und -Dimere	350
8.9	<i>Sequential walk</i> des Heterodimers 29d	352
8.10	Analytische Daten der LEH-Mutanten 1 und 2.....	354
8.11	Sequenzen der transfizierten Antikörper.....	356
8.12	Analytik des mAb Cl4-Antikörpers	357
8.13	ELISA-Tests der Kontrollgruppe	358
	Abkürzungen	359

1. Einleitung

Synthetische Peptide eignen sich hervorragend, um die molekularen Grundlagen der Autoimmunität, bei der ein Organismus nicht mehr zwischen Fremd und Selbst unterscheiden kann, zu erforschen.^[1,2] Folglich dienen sie als wichtige diagnostische Marker für Autoimmunerkrankungen.^[3,4] In der vorliegenden Arbeit wurden Filaggrin-abgeleitete Peptidepitope in definierten *hairpin*-Konformationen (Zickzack-Darstellung in Abbildung 1.1) synthetisiert und analysiert, um sie auf ihre Affinität gegenüber Autoantikörpern zu testen, die bei rheumatoider Arthritis (RA) auftreten. Ihre Periodizität ($4n$ oder $4n+2$ Aminosäuren) wurde eingehend untersucht, wobei ungewöhnliche dimere und disulfidreiche Struktur motive gewonnen werden konnten, die Anwendung im *de novo*-Design von Proteinen fanden.

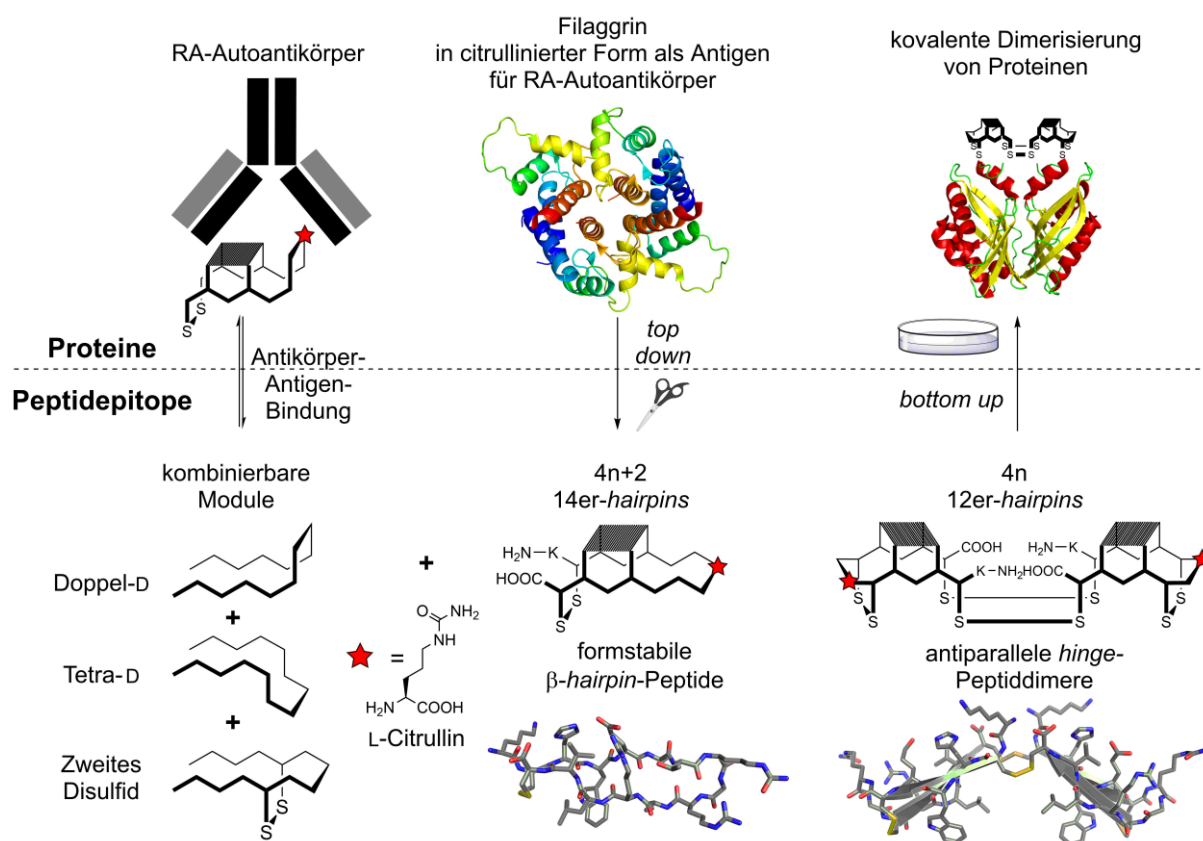


Abbildung 1.1. Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit angewandten Konzepte. Filaggrin-abgeleitete Peptide (*top down*, Mitte) wurden als β -hairpin-Epitope fixiert. Sie wurden mit synthetischen Modulen kombiniert, um gezielt deren Konformation zu beeinflussen und diese mit ihrer Affinität gegenüber RA-Autoantikörpern zu korrelieren (links). Je nach Anzahl n der Aminosäuren und der damit einhergehenden *hairpin*-Periodizität wurden Monomere (14er-hairpins) oder Dimere (12er-hairpins) erhalten. Ein dimeres Scharnier-Strukturmotiv (engl. *hinge*) mit acht Cysteinen wurde in einem *bottom up*-Ansatz in größere Proteinstrukturen *de novo* eingebracht (rechts).

Worum es sich bei Peptidepitopen handelt, wird in Kapitel 1.1 geklärt, um in Abschnitt 1.2 auf die Epitop-Eignung von *hairpin*-Peptiden einzugehen. Dabei werden Synthesemethoden und Designelemente beschrieben, mit denen die *hairpin*-Konformation systematisch beeinflusst werden kann. In Kapitel 1.3 werden im Speziellen Autoimmunepitope erörtert, deren Kenntnis für die Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst durch einen Organismus essentiell ist. Der Krankheitsverlauf der Autoimmunerkrankung RA, der die Ausbildung einer Vielzahl von Autoantikörpersubtypen zur Folge hat, und deren serologische Diagnostik werden in Kapitel 1.4 beschrieben. Im Rahmen der Arbeit wurden (RA-)Peptidepitope mit D-Aminosäuren modifiziert, deren Besonderheiten in Abschnitt 1.5 beschrieben sind. Gleichzeitig enthalten sie meist eine oder mehrere Disulfidbrücken und zählen damit zu den disulfidreichen Peptiden, die zusätzliche Herausforderungen an die chemische Synthese stellen (enthaltene Thiole müssen regioselektiv zu Disulfiden oxidiert werden, Kapitel 1.6). Neben Monomeren können durch intermolekulare Disulfidverbrückung auch Dimere oder Oligomere entstehen (1.6.2). Peptidepitope werden, wie erwähnt, als diagnostische Marker und damit zur indirekten Charakterisierung ihrer Bindungspartner, der Paratope (Antikörper), herangezogen. Abschnitt 1.7 beleuchtet den Aufbau und die Dynamik dieser disulfidreichen Proteine, deren sogenannte *hinge*-Region (englisch für Scharnier) von besonderer Bedeutung für die Homodimerisierung zweier Proteinhälften ist. Methoden für die Darstellung multipler Antigene (jenseits von Disulfidbrücken), die in der Natur eine viel wesentlichere Rolle als entsprechende Monomere einnehmen, werden in Kapitel 1.8 diskutiert. Systematische Scanmethoden, die lokale (Positionsscan) oder globale (mehrdimensionale Scans) Einflüsse auf Peptide aufzeigen, sind Inhalt von Abschnitt 1.9. Wie die NMR-Spektroskopie hilft, die Konformation der hergestellten Biomoleküle in Lösung zu analysieren, ist Inhalt des abschließenden Einleitungskapitels 1.10.

1.1 Peptidepitope

Die biologische Aktivität vieler Proteine wird über Oberflächenregionen aus kurzen, freiliegenden Aminosäuresequenzabschnitten mit wohldefinierter dreidimensionaler Struktur, sogenannten Epitopen, vermittelt.^[5] Versucht man, diese isoliert vom Gesamtprotein zu synthetisieren, um eine bestimmte biologische Aktivität nachzuahmen, bilden sie in wässriger Lösung jedoch meist keine Vorzugskonformation aus (Abbildung 1.2).^[6,7] Trotz der fehlenden Vorzugskonformation kann ein flexibles *random coil*-Epitop (*rc*) verschiedene, aber ähnliche Antikörper bzw. Antikörpersubtypen binden. Diese Antikörperpromiskuität^[8] ist eine Folge von konformationeller Anpassung (*conformational selection*, Abbildung 1.3).

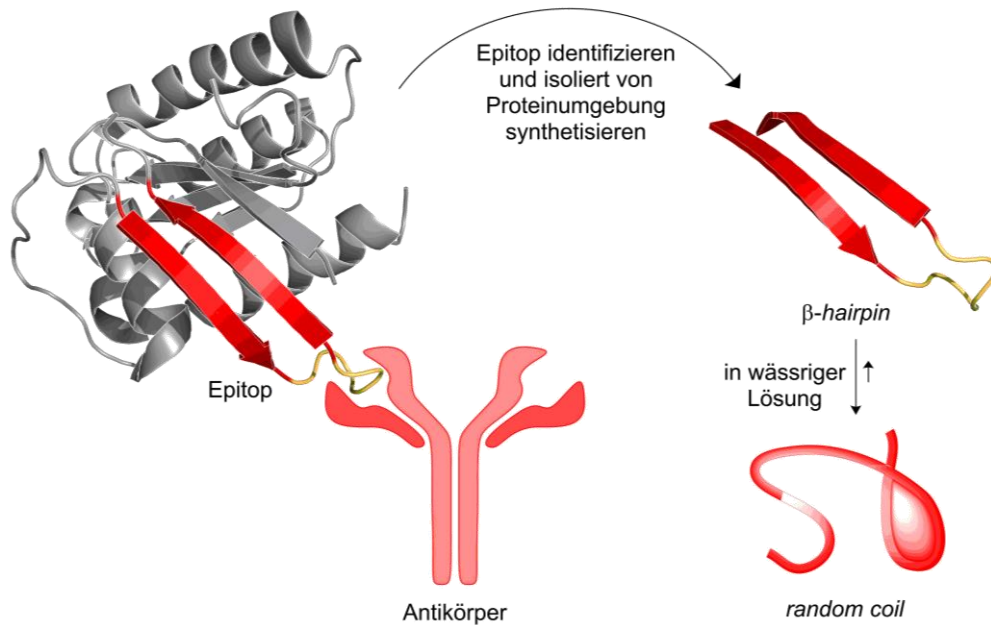


Abbildung 1.2. Die Sequenzabschnitte innerhalb eines Proteins, die für die Erkennung bspw. eines Antikörpers von Bedeutung sind, werden Epitope genannt (Proteinstruktur aus PDB-Datenbank, 4klz). Ist die entsprechende Peptidsequenz aufgeklärt, kann ein solches Epitop auch isoliert von der Proteinumgebung synthetisiert werden. In diesem Fall bildet das Biomolekül allerdings meistens keine Vorzugskonformation in wässriger Umgebung aus.

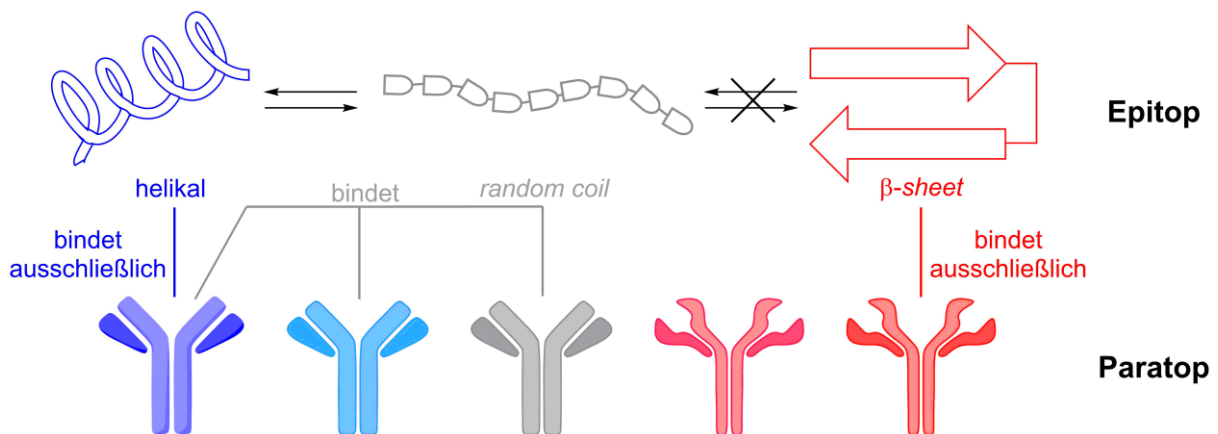


Abbildung 1.3. *Random coil*-Peptide ohne Vorzugskonformation in Lösung zeigen eine Antikörperpromiskuität durch konformationelle Anpassung (z. B. durch Annehmen einer helikalen Struktur, links). Dabei ist allein das Vorhandensein der biologisch aktiven Primärsequenz ausschlaggebend. Fixiert man das Epitop in einer Nicht-Gleichgewichts-Konformation, die das *rc*-Peptid selbst nicht einnehmen kann (hier β -sheet, rechts), so sollten bisher unerkannte Antikörper detektiert werden können, für andere Paratope muss die geeignete Konformation noch gefunden werden. Es handelt sich dann um ein assembliertes oder konformationelles Epitop. Dies gilt auch für die helikale Struktur, wenn sie nicht im Gleichgewicht mit weiteren biologisch relevanten Konformationen steht.

Viele Bereiche des RAMACHANDRAN-Plots und damit einhergehende Konformationen sind einem solchen *rc*-Peptid jedoch nicht zugänglich. Die hohe Spezifität der Antikörperbindung beruht aber gerade auf einer angepassten räumlichen Struktur des Bindungspartners.^[9,10] Wenn für eine Paratopbindung die korrekte Primärsequenz allein nicht ausreichend ist, spricht man von einem assemblierten oder konformationellen Epitop. Dabei spielt also die korrekte (nicht im Gleichgewicht stehende) dreidimensionale Anordnung von nicht-sequenziell benachbarten Aminosäuren und deren Seitenketten die entscheidende Rolle. Fixiert man ein Epitop in einer bestimmten Konformation, sollte es dementsprechend einerseits möglich sein, eine höhere Antikörperselektivität zu erreichen, andererseits auch Paratope zu identifizieren, deren Erkennung mit einem flexiblen Peptid nicht möglich ist.

Damit kurze Peptidstränge auch in Wasser eine thermodynamisch stabile Konformation einnehmen und als konformationelle Epitope dienen können, bedient sich der Chemiker verschiedenster Modifikationen innerhalb der Sequenz.^[5,11] Von der einfachen Aminosäuremutation über die Zyklisierung des Peptids bis hin zum Einbau unnatürlicher Bausteine steht ein breites Arsenal an Modulationen zur Verfügung. Im Folgenden soll dabei vor allem auf das Design von isolierten, selbstständig faltenden β -*hairpins* eingegangen werden, da dieses Strukturmotiv bei vielen Erkennungsprozessen von Proteinen eine entscheidende Rolle spielt und in der vorliegenden Arbeit das zentrale synthetische Grundgerüst liefert.

1.2 *Hairpins* als Peptidepitope - Design und Stabilität

β -*hairpins* sind Sekundärstruktur motive, bei denen zwei antiparallele β -*sheet*-Stränge über einen *turn* miteinander verbunden sind (Abbildung 1.4).^[12] Sie eignen sich besonders gut zur Untersuchung der Affinitäts-Konformations-Beziehung von Epitopen.^[13–15] Die räumliche Ausrichtung der jeweiligen Aminosäuren und ihrer Seitenketten lässt sich in diesem Netzwerk aus abwechselnd Wasserstoffbrücken-gebundenen und nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Positionen sehr gut abstimmen. Zudem befinden sich Seitenketten durch die Zickzack-ähnliche Struktur des *hairpins* abwechselnd auf der Ober- bzw. Unterseite der Peptidebene, sodass sich direkt und diagonal gegenüberliegende Aminosäurepaare (Abbildung 1.4, Rest R) ergeben und positive Wechselwirkungen durch deren räumliche Nähe ausnutzen lassen. Gleichzeitig entstehen relativ zum *backbone* verschiedene Seiten mit ihrem ganz eigenen Muster an Aminosäureseitenketten. Eine dieser Seiten bindet das Paratop, während die andere eine indirekte Rolle spielt. β -*hairpin*-Epitope sind damit sprichwörtlich aus nicht-benachbarten

Aminosäuren assembliert. In diesem Zusammenhang werden Peptidliganden besonders oft in Form von *turns* oder *loops* gebunden,^[16–19] die sich auf dem *hairpin*-Gerüst stabilisieren, präsentieren und durch eine Vielzahl von chemischen Modifikationen variieren lassen.

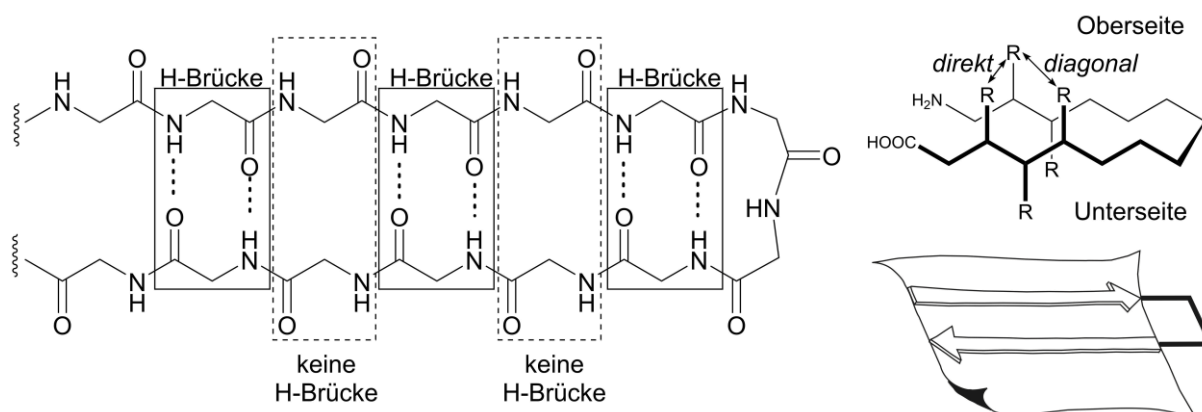


Abbildung 1.4. Verschiedene Darstellungsformen eines *hairpin*-Peptids, die in der vorliegenden Arbeit genutzt werden. Die linke LEWIS-Formel eignet sich, um das alternierende Wasserstoffbrückenbindungsmuster zu verdeutlichen. Rechts oben ist eine (vereinfachende) Zickzack-Struktur dargestellt, die veranschaulicht, dass Seitenketten (R) abwechselnd ober- bzw. unterhalb der Ebene des Peptidrückgrats orientiert sind und sich direkt bzw. diagonal gegenüberliegende Paare ergeben. Darunter illustriert ein bänderähnliches Modell den Aufbau des *hairpins* aus zwei antiparallelen β -sheets (Pfeile), die über einen *turn* miteinander verknüpft sind.

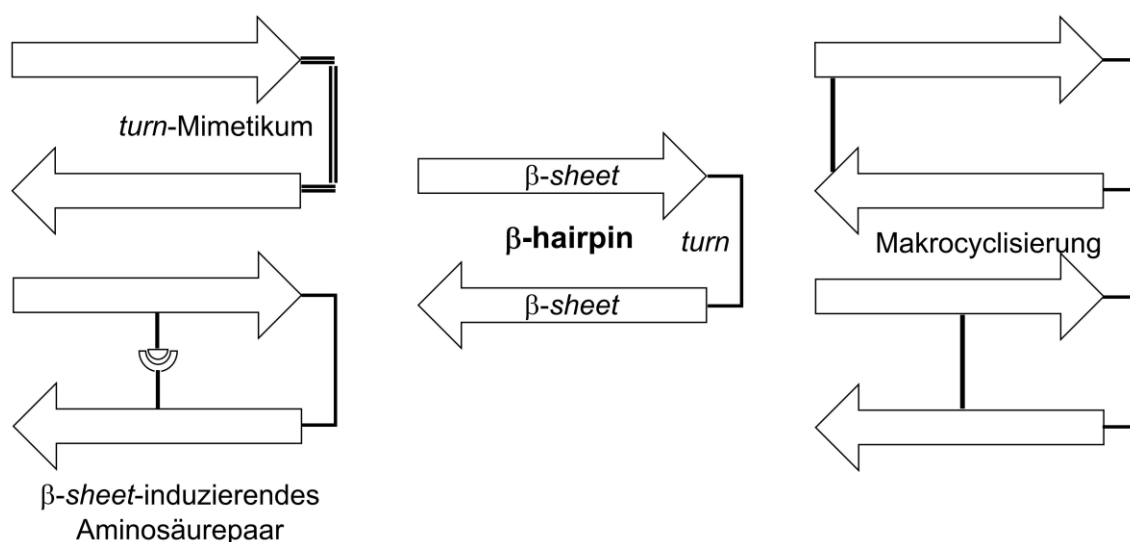


Abbildung 1.5. Synthetische Möglichkeiten zur Stabilisierung einer *hairpin*-Konformation. In den Abbildungen 1.6 bis 1.8 werden diese detailliert beschrieben.

Um ein *hairpin*-Peptid mit Vorzugskonformation zu entwerfen, gibt es verschiedenste synthetische Möglichkeiten (Abbildung 1.5):^[5,11,20] Interne sowie terminale Makrocyclisierungen verringern Freiheitsgrade^[21] und sorgen dafür, dass sich Seitenketten räumlich annähern und so positive Wechselwirkungen leichter ausbilden können. Cyclisierungsmöglichkeiten bieten unter anderem die *head-to-tail*-Verknüpfung des Peptidrückgrats,^[22–24] eine *sidechain-to-tail*-Verknüpfung (oder eine Kombination der eben genannten Verknüpfungsmethoden),^[25] Disulfidbrücken^[26–28] oder 1,2,3-Triazolringe^[29,30] (Abbildung 1.6).

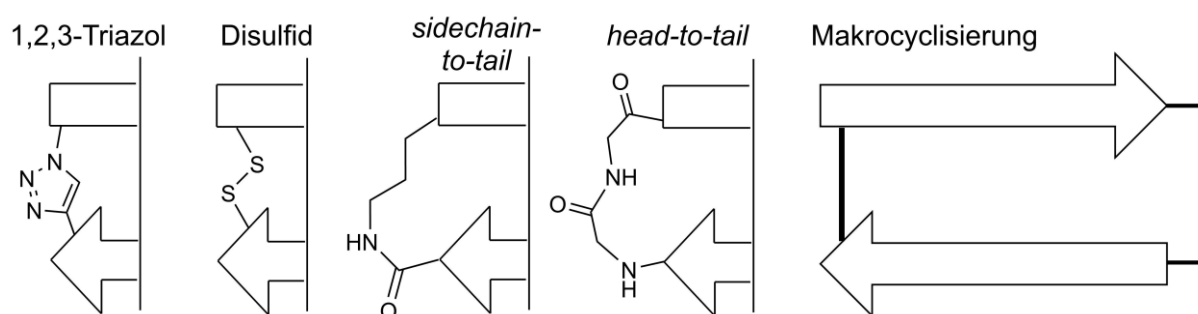


Abbildung 1.6. Möglichkeiten zur Makrocyclisierung von β -*hairpins*. Diese kovalenten Bindungsbildungen sind nicht auf die terminalen Enden des *hairpins* beschränkt, sondern können auch intern verwendet bzw. kombiniert werden.

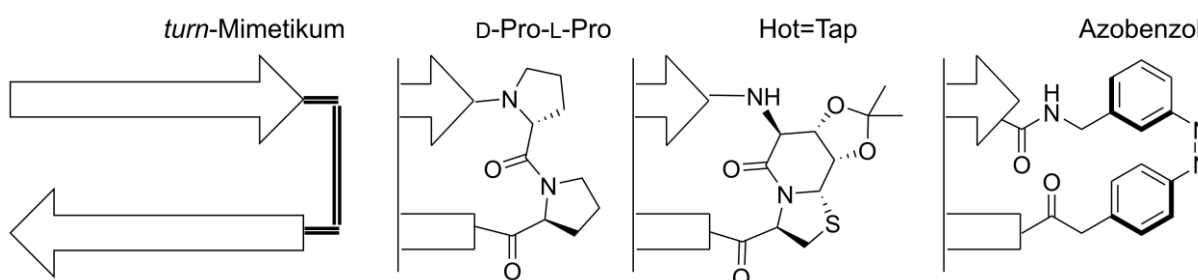


Abbildung 1.7. Turn-Mimetika in β -*hairpins*.

Turn-Mimetika sind Bausteine, die eine *turn*-Struktur bevorzugt ausbilden bzw. nachahmen und dadurch effektiv eine *hairpin*-Bildung induzieren (Abbildung 1.7).^[31] Neben D-Aminosäuren, bevorzugt in *i+1*-Position,^[32,33] und Dipeptidkombinationen mit und ohne Prolin (z. B. die viel verwendeten D-Pro-L-Pro^[34–36] und D-Pro-Gly-Motive^[37–39], ebenso Aib-Gly^[40] oder Asn-Gly^[41,42]) wurden eine Vielzahl von ungewöhnlichen molekularen Gerüsten beschrieben. Dazu zählen bspw. das bicyclische BTD (*bicyclic turned dipeptide*),^[43] das davon abgeleitete, synthetisch jedoch leichter zugängliche Hot=Tap (Hot: γ -Hydroxythreonin,

Tap: 4-Thiaprolin)^[44] oder Azobenzole, die es ermöglichen, eine *hairpin*-Konformation durch Lichteinwirkung und eine damit einhergehenden *cis-trans*-Isomerie zu induzieren.^[45]

In einem antiparallelen β -sheet wird die Stabilität außerdem von den Interaktionen der Seitenketten bestimmt. Dabei sind unterschiedliche Typen von Wechselwirkungen (z. B. hydrophob, elektrostatisch, π -Kation; siehe Abbildung 1.8) möglich. Gleichzeitig spielt die Position auf dem β -sheet eine entscheidende Rolle, also ob es sich um eine Wasserstoffbrücken-Position handelt, ob sich die Aminosäureseitenketten direkt oder diagonal gegenüberstehen und wie weit sie von der *turn*-Region entfernt sind.^[20,46] Ein Beispiel für extrem stabile *hairpin*-Peptide sind die sogenannten *tryptophan zippers* (Trpzip), die einen hydrophoben Cluster aus zwei gegenüberliegenden Tryptophan-Paaren in nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Positionen enthalten.^[47] Die Indolreste nehmen dabei eine *edge-to-face*-Anordnung ein. Daneben haben sich aromatische Paare wie Y/W^[48] und F/F^[22,39] bewährt. Weiterhin ist bekannt, dass auch ionische Wechselwirkungen (bspw. zwischen Lysin und Glutamat) die Stabilität der Sekundärstruktur erhöhen und ein „Ausfransen“ (*fraying ends*) der Termini verhindern.^[49,50] Diese Wechselwirkungen sind pH-abhängig, da sie durch unterschiedliche Protonierungsgrade beeinflusst werden. Die COULOMB-Wechselwirkung der Ionen an der Oberfläche wird durch die hydrophoben Interaktionen der zugehörigen Alkylketten zusätzlich stabilisiert. Während π -Kation-Wechselwirkungen einen positiven Beitrag zur *hairpin*-Stabilität leisten,^[51,52] sind π -Anionen-Interaktionen nachteilig.^[53] Häufig führt die Kombination von mehr als einer positiven Wechselwirkung zu kooperativen und damit energetisch noch günstigeren Faltungen, sodass sich innerhalb des *hairpins* hydrophobe Cluster ausbilden. Beispiele dafür sind die bereits genannten Tryptophanpaare in den Trpzip-Peptiden,^[47] der Cluster W/V/Y/F im *hairpin* des GB1-Proteins^[54,55] oder Y/L/R/W im *hairpin* des Foldons^[56] (beide kommen in der Natur vor) sowie der von COCHRAN *et al.* entworfene Cluster der bhp-Peptide (N-terminal CHWE/RLVC C-terminal).^[57]

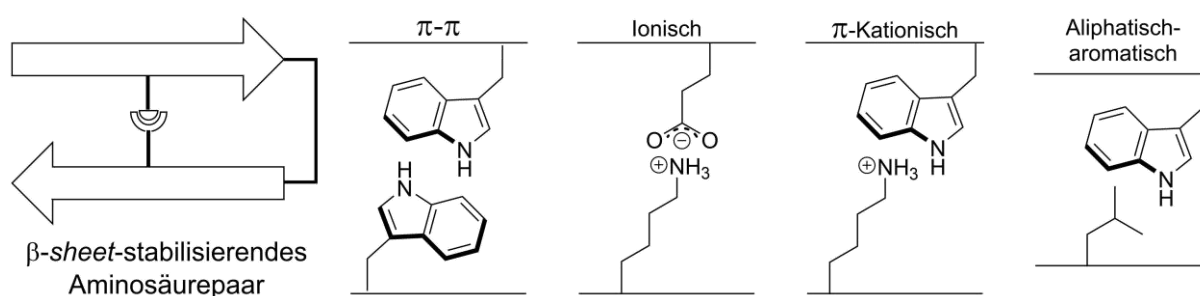


Abbildung 1.8. Aminosäurepaare mit verschiedenen Arten von anziehenden Wechselwirkungen, die alleine oder im Verbund als hydrophobe Cluster β -*hairpin*-Konformationen stabilisieren können.

Es steht also eine Vielfalt an synthetischen Methoden zur Verfügung, um Peptidkonformationen festzulegen bzw. zu stabilisieren. Die chemische und konformationelle Homogenität spielen eine wichtige Rolle für synthetische Peptidepitope, die in der serologischen Diagnostik Einsatz finden sollen (siehe Kapitel 1.3).

1.2.1 Die intrinsische Dynamik von β -hairpin-Peptiden

Die in Abbildung 1.4 verwendeten Zickzack- und Cartoon-Darstellungen sind statische Repräsentationen eines eigentlich hochdynamischen Systems. β -hairpins, als Modellsystem für antiparallele β -sheets, zeichnen sich nämlich durch eine hohe Dynamik und kooperative Beweglichkeit aus, die in Lösung zu ihrer Stabilität beitragen.^[58,59] Das antiparallele Faltblatt besteht, wie bereits beschrieben, aus sich abwechselnden H-Brücken- und nicht-H-Brücken-Positionen, sodass miteinander verknüpfte kleine und große H-Brücken-Bindungsringe entstehen (vgl. Abbildung 1.9, rechts). Diese Strukturen können einerseits wie ein Akkordeon komprimiert werden, sich andererseits zu rechtsgängigen Doppelhelices winden (durch Verdrillen und Biegen des Peptidrückgrats^[60]). Diese beiden Bewegungsformen eines β -hairpins sind isoenergetisch, symmetrieerhaltend und erfordern dementsprechend Anpassungen aller ϕ - und ψ -Winkel (Abbildung 1.9, links). Derartige Adaptionen unterscheiden sich für die erwähnten großen und kleinen H-Brücken-Ringe, erfolgen jedoch korreliert zueinander. Eine detaillierte Betrachtung dieses Sachverhaltes ist in Abbildung 1.9 wiedergegeben. Die Unabhängigkeit von Akkordeon- und Verdrillungsbewegungen ermöglicht eine kontinuierliche Umwandlung zwischen allen in Abbildung 1.9 rechts gezeigten Konformationen.^[59] Damit besitzt die β -hairpin-Sekundärstruktur eine außergewöhnliche konformationelle Flexibilität. In einer α -Helix bspw. wäre eine derartige konzertierte Veränderung von ϕ - und ψ -Winkeln nicht ohne Deformierung oder H-Brückenbindungsbruch möglich.^[61] Auch für parallele β -sheets, die zwar das gleiche alternierende Wasserstoffbrückenmuster besitzen, durch die parallele Anordnung der Stränge jedoch immer gleich große, trapezförmige H-Brücken-Bindungsringe aufweisen, wird eine derartige Flexibilität nicht beobachtet.^[58,62]

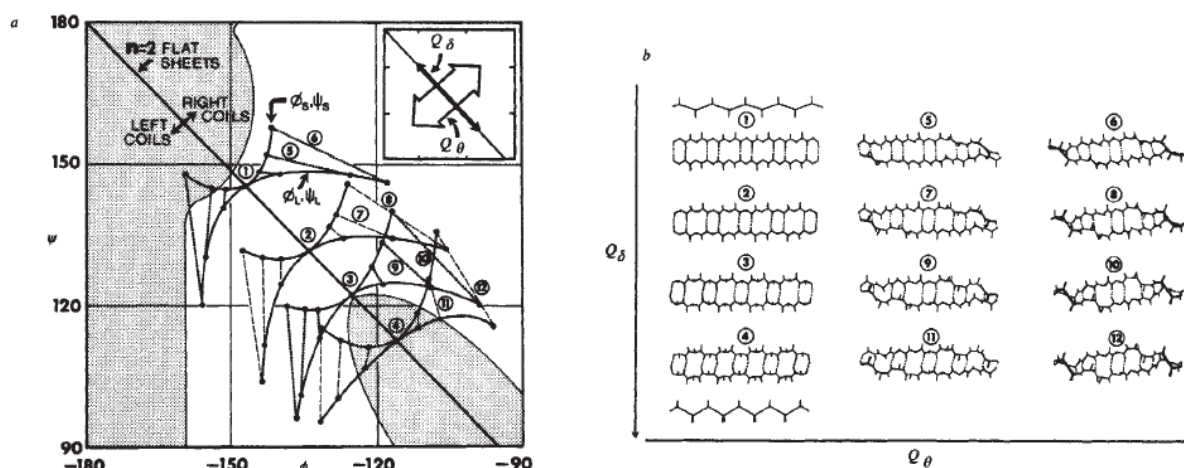


Abbildung 1.9. RAMACHANDRAN-Plot (links) für einen gestreckten β -Strang (*extended sheet*), also flache Stränge mit hypothetisch identischen ϕ - und ψ -Winkeln für alle Aminosäuren innerhalb der Sequenz. Entlang dieser Linie des Plots liegt ein Kontinuum von flachen β -sheets, wie sie rechts mit den entsprechenden Nummern (von oben nach unten, also 1 bis 4) gezeigt sind. Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer jeweiligen Kompression (Q_δ , y-Achse rechts), ähnlich dem Balg eines Akkordeons. Gleichzeitig ist jede der Strukturen in der Lage sich um einen bestimmten Betrag (Q_θ , x-Achse rechts) zu verdrillen (*twist*), sodass eine doppelhelikale Struktur entsteht. Für diese Bewegungen sind korrelierte Veränderungen in den ϕ - und ψ -Winkeln erforderlich, wie sie links im Plot durch die gestrichelten Linien verbunden sind. In einem antiparallelen β -sheet entstehen durch die Abfolge der Wasserstoffbrücken- und nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Positionen kleine (*small*, s) und große (*large*, l) H-Brücken-Bindungsringe, deren ϕ - und ψ -Winkel entsprechend mit s oder l gekennzeichnet sind. Die grau hinterlegten Bereiche beschreiben ungefähr diejenigen *sheet*-Konformationen, die sterisch nicht erlaubt sind.^[59] Nachgedruckt mit der Erlaubnis der Macmillan Publishers Ltd.: *Nature* **1982**, 288, 754-756, copyright 2018.

1.3 Autoimmunepitope - Fremd und Selbst

Welche Eigenschaften muss ein Peptid besitzen, um als Epitop erkannt zu werden? Damit einher geht auch die Frage, wie das Immunsystem eines Organismus zwischen körpereigenen (Selbst) und körperfremden Substanzen (Nicht-Selbst/Fremd) unterscheidet.^[1,63,64] Antworten darauf tragen auch zum Verständnis aller damit zusammenhängender Phänomene wie Toleranz, Autoimmunität oder Allergie bei. Seit den 1950er Jahren herrscht der allgemeine Konsens, dass die mehr oder weniger phänomenologische Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd die entscheidende Rolle spielt. Dem liegen die beiden folgenden Thesen zugrunde:

- 1) Entitäten, die dem Organismus fremd sind, also zur Kategorie Fremd gehören, lösen eine Immunreaktion aus

- 2) Entitäten, die zum Organismus gehören, also zur Kategorie Selbst zählen, lösen keine Immunreaktion aus.

Diese Aussagen erscheinen jedoch als eher vage und halten einer detaillierten Untersuchung der molekularen Immunforschung nicht stand.^[1,64–69] Mit einer solchen vereinfachten Zweiteilung sind die komplexen Mechanismen einer Autoimmunerkrankung, bei der sich das Immunsystem gegen körpereigenen Proteine richtet,^[70] nicht erklärbar.

In vielen Studien wurde deshalb das Konzept der geringen Ähnlichkeit herangezogen.^[71–74] Nur Peptidmotive mit keiner oder geringer Ähnlichkeit zum Wirt-Proteom stellen Fremdepitope für das Immunsystem dar. Bei Immuninteraktionen spielen also nur Aminosäuresequenzen, die in Proteinen des Organismus selten oder gar nicht auftreten, eine Rolle. Dies gilt für kontinuierliche wie auch für diskontinuierliche Epitope, die die relevanten Aminosäuren in einen räumlichen Kontext mit geringer Ähnlichkeit bringen.^[1,2] So können bei Kenntnis des Proteoms eines Organismus zwar seltene Primärsequenzen als immunogen vorhergesagt werden, die Feinbestimmung von konformationellen Epitopen bleibt jedoch schwierig, da eine exakte Vorhersage darüber, welche teilweise weit voneinander entfernten Aminosäuren für eine Immunreaktion in räumliche Nähe treten müssen, kaum möglich ist.

Die Stabilisierung von Peptidepitopsequenzen und deren Haptenen in festgelegten Konformationen spielt deshalb eine wichtige Rolle für die Aufklärung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und für die Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst. Dies ist im Besonderen dann der Fall, wenn der menschliche Organismus selbst diese Unterscheidung nicht mehr fehlerfrei durchführen kann. Nach der oben genannten Definition ist er nicht mehr in der Lage, Aminosäuresequenzen mit eigentlich großer Ähnlichkeit zum eigenen Proteom als ungefährlich zu erkennen. Dies kann auch dann zutreffen, wenn solche Sequenzen aufgrund von (unkontrollierten) Proteinmodifikationen ihre Ähnlichkeit verlieren (wie es bei der rheumatoiden Arthritis durch Citrullinierung der Fall ist, siehe Kapitel 1.4). In jedem Fall werden fälschlicherweise körpereigene Strukturen vom Immunsystem angegriffen. Dieser Zustand wird als Autoimmunerkrankung bezeichnet.^[70] Dabei besitzen Peptide, die die krankheitsrelevanten Epitope in ihrer Konstitution und Konformation nachahmen, eine immense Bedeutung für die Diagnostik und die Aufklärung molekularer Mechanismen, wie im folgenden Kapitel beschrieben.

1.3.1 Synthetische Peptidepitope als diagnostische Werkzeuge

Systemische Autoimmunerkrankungen zeichnen sich dadurch aus, dass der Körper fälschlich gesundes Gewebe angreift und im Zuge dessen Autoantikörper bildet.^[70] Diese im Blutserum

eines Patienten vorhandenen Autoantikörper können mit Hilfe von komplementären Peptidepitopen nachgewiesen werden und somit wichtige Rückschlüsse auf das Vorhandensein einer Krankheit und in einigen Fällen sogar auf deren Verlauf liefern. Peptide, die als antigene Determinante^[75] identifiziert wurden (*epitope mapping*, vgl. Abbildung 1.10), dienen somit als serologische Marker, die in der klinischen Diagnostik von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.^[3,4]

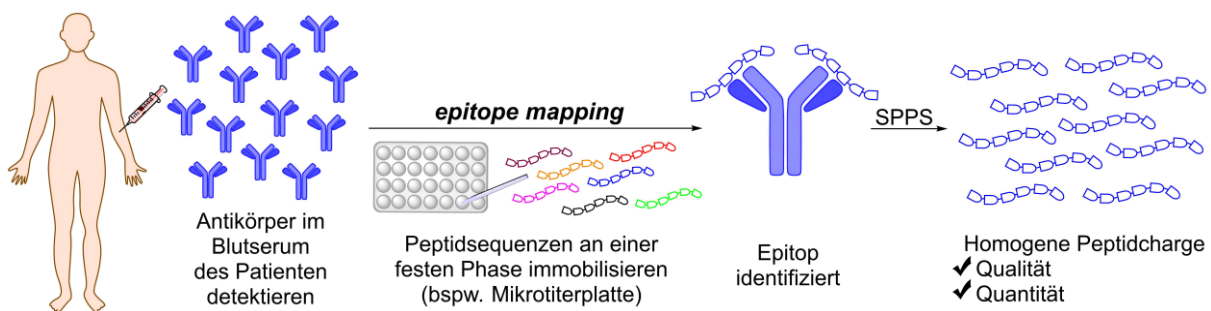


Abbildung 1.10. Vorgehensweise für das Identifizieren von geeigneten Peptidepitopen (*epitope mapping*), die einen aus dem Blutserum eines Patienten gewonnenen Antikörper binden. Die so aufgeklärte Sequenz kann anschließend durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) in hoher Qualität und Quantität für die serologische Diagnostik einer Autoimmunerkrankung hergestellt werden.

Für derartige Tests ist die chemische Homogenität der hergestellten Peptidcharge unerlässlich. Mit Hilfe der von BRUCE MERRIFIELD entwickelten Festphasensynthese (SPPS, engl.: *solid phase peptide synthesis*, Nobelpreis 1984) steht dem Chemiker eine Synthesetechnologie zur Verfügung, die die Herstellung von Peptiden in reproduzierbarer Quantität und Qualität ermöglicht.^[76,77] Sie liefert einen immensen Vorteil im Vergleich zu hochvariablen biologischen Systemen als Antigenquellen. Verschiedene Studien belegen, dass Immunassays auf der Basis synthetischer Peptide deutlich sensitiver sind als solche, die entsprechende rekombinante oder native Antigene verwenden.^[78–81] Ein kurzes Peptid (bestehend aus etwa 15–50 Aminosäuren), das die für die Antikörperbindung essentiellen Bausteine enthält, ist in vielen Fällen also dem Protein voller Länge (etwa 300 Aminosäuren), von dem das Peptid abstammt, vorzuziehen. Gründe für die höhere Sensitivität liegen bspw. in der bereits genannten höheren Homogenität und Reinheit von Peptidantigenen, einer besseren Zugänglichkeit des Epitops als in komplex gefalteten Proteinen und einer höheren molaren Konzentration des Peptids gegenüber dem Protein bei gleicher Massenkonzentration. Letzteres macht den Einsatz der kürzeren Biomoleküle auch unter ökonomischen Gesichtspunkten interessanter. Die SPPS ermöglicht außerdem die direkte Modifikation der chemischen Struktur durch den Einbau

unnatürlicher Aminosäuren (bspw. D-Aminosäuren), die Einführung posttranslationaler Modifikationen (z. B. Citrullinierung), die kovalente Verknüpfung gewünschter Moleküle (wie Fettsäuren, Biotin, Fluoreszenzlabel) sowie die Cyclisierung oder Oligomerisierung des Epitops. Diese Optionen stehen bei der Expression von Proteinen aus biologischen Systemen nicht zur Verfügung.

Die Diversität an Autoimmunerkrankungen, die häufig zu schweren körperlichen Behinderungen führen und als Gruppe eine Verbreitung von etwa 5% innerhalb der Gesamtbevölkerung zeigen,^[82,83] macht eine verlässliche und frühzeitige Erkennung besonders wichtig. Eine Vielzahl dieser Autoimmunerkrankungen wird mittlerweile auf Basis von Peptidantigenen diagnostiziert.^[3,4] Tabelle 1.1 enthält eine beispielhafte Übersicht mit zugehörigen Sequenzen.

Tabelle 1.1. Übersicht über ausgewählte Autoimmunerkrankungen, identifizierte Autoantigene und deren Sequenz (Cit: L-Citrullin, sDMA: symmetrisches Dimethylarginin).

Autoimmunerkrankung	Autoantigen	Aminosäuresequenz	Referenz
Rheumatoide Arthritis	CCP	HQCHQESTCitGRSRGRGRSGS	[84]
Lupus Erythematoses	Sm-Peptid	AARG(sDMA)GRGMGRGNIF	[80]
Sjögren-Syndrom	α -Fodrin	RQKLEDSYRFQFFQRDAEEL	[85,86]
Polymyositis-Sklerodermie-Syndrom	Pm/Scl	LDVPPALADFIHQQR	[79]
Systemische Sklerose	Topo-I (Scl-70)	RIANFKIEPPGLFRGRGNHP	[87]

1.4 Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Gelenkerkrankung. Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung, die etwa 1 % der Weltbevölkerung betrifft.^[88–90] Während des Krankheitsverlaufs werden folglich Autoantikörper ausgebildet, die mit komplementären Antigenen detektiert und analysiert werden können.^[91] Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Aminosäure Citrullin (Cit), die durch Deiminierung von Arginin durch das Calcium-gesteuerte Enzym Peptidylarginin-Deiminase (PAD) in Proteinen entsteht.^[92–94] Eine vergleichbar kleine Veränderung einer unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Guanidin-Seitenkette zu einem ungeladenen, aber isosteren Harnstoff (Abbildung 1.11) hat einen immensen Einfluss auf Proteinfaltungen und damit deren Funktion. Harnstoff ist dafür

bekannt, eine elektronenreiche, planare Struktur und gute metallbindende Eigenschaften zu besitzen.^[95]

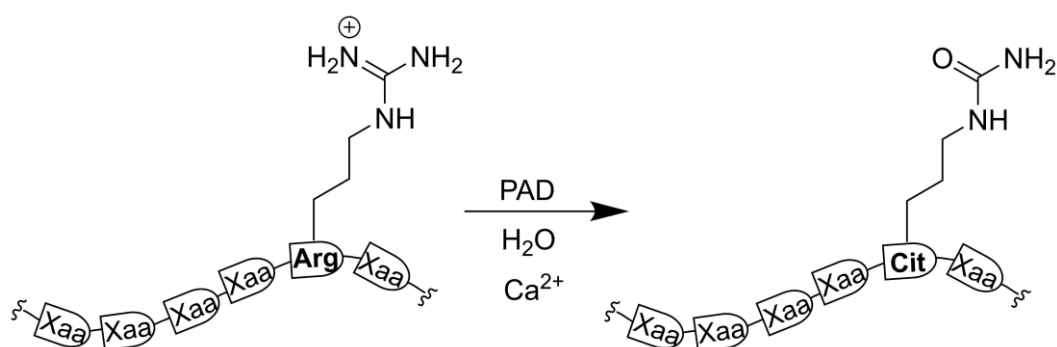


Abbildung 1.11. Enzymatische Modifikation eines positive geladenen Peptidylarginins zu einem ungeladenen Peptidylcitrullin durch das Ca^{2+} -abhängige Enzym Peptidylarginindeiminase (PAD).

Eine angemessene Therapie zur Bekämpfung der Krankheit und ihres Fortschreitens kann nur dann gewährleistet werden, wenn die Diagnose möglichst früh gesichert wird.^[96] Auf diese Weise kann der Arzt therapeutisch eingreifen, bevor irreversible Gelenkschädigungen auftreten. Von Vorteil ist dabei, dass Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine schon früh im Verlauf der RA auftreten. Das Verständnis des Entstehungszyklus innerhalb der Synovia (Gelenkflüssigkeit) hilft dabei, die Vielzahl und Heterogenität der Autoantikörperprofile in RA-Patienten nachzuvollziehen (Abbildung 1.12).^[97–100]

Die fünf Hauptschritte erklären sich wie folgt:

1. Eine eigentlich unproblematische Entzündung eines Gelenks oder anderen Körpergewebes führt zum Eindringen von Immunzellen (das sind vor allem weiße Blutkörperchen, auch Leukozyten genannt, also Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten). Normalerweise sterben diese eindringenden Zellen während der Apoptose, dem Zelltod, und werden anschließend von Phagozyten (Fresszellen) entfernt. Liegt ein (genetischer) Defekt in diesem Beseitigungssystem vor, enthält die Zelle Giftstoffe oder ist anderweitig infiziert, kann eine apoptotische (kontrollierter Zelltod) Zelle nekrotisch (zufälliger/unkontrollierter Zelltod) werden. Durch einen akut schädigenden, äußeren Einfluss wird die Zelle zerstört und der Zellinhalt tritt unkontrolliert aus. Die weißen Blutkörperchen enthalten citrullinierende PAD, die durch den erhöhten Gehalt an Ca^{2+} -Ionen, der während apoptotischen Prozessen auftritt, aktiviert wird.

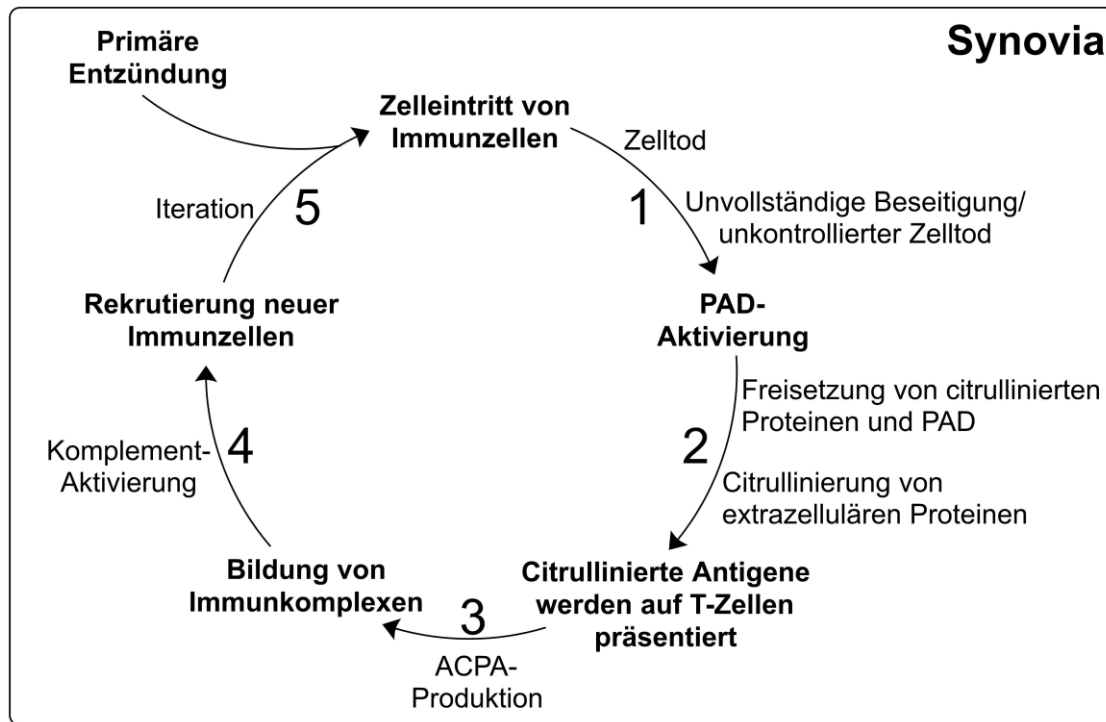


Abbildung 1.12. Der Entstehungszyklus der RA in der Synovia (Gelenkflüssigkeit) in fünf Schritten.^[97,98] Die zentrale Rolle der Citrullinierung von Proteinen wird in den gezeigten fünf Hauptschritten deutlich (ACPA (engl.): *anti-citrullinated peptide antibody*, Antikörper gegen citrullinierte Peptide; PAD: Peptidylarginindeiminase).

2. Neben den citrullinierten Proteinen aus den nekrotischen Immunzellen, citrulliniert das im ersten Schritt aktivierte PAD nun auch extrazelluläre Proteine in der Synovia (wie bspw. Fibrinogen). Diese citrullinierten Proteine führen aber normalerweise nicht zu einer chronischen Entzündung, sondern werden ohne humorale Reaktion des Immunsystems abgebaut. Es wurde nachgewiesen, dass sich eine Vielzahl verschiedener citrullinierter Proteine im entzündeten Synovia befindet (siehe bspw. Review ^[101]).

3. Eine Immunantwort auf citrullinierte Antigene wird in denjenigen Individuen angeregt, die citrullinierte Fragmente von Proteinen auf der Zelloberfläche für T-Zellen präsentieren können. Dies wiederum stimuliert Antikörper-produzierende B-Zellen und führt zur Produktion von hochaffinen ACPAs (Antikörper gegen citrullinierte Peptid, engl.: *Anti-citrullinated Peptide Antibodies*).^[102] Diese IgGs zirkulieren nun im Blutkreislauf und können letztendlich zu anderen entzündeten Geweben/Gelenken gelangen. Dort bilden sie Immunkomplexe mit den reichlich vorhandenen citrullinierten Antigenen.

4. Die entstandenen/entstehenden Immunkomplexe, die sich sowohl im Plasma als auch im entzündeten Synovia nachweisen lassen,^[103] verstärken den Entzündungsprozess, da sie das Komplement-System aktivieren, wodurch weitere Immunzellen gebildet werden. ACPAs

sorgen auf diese Weise für die Aufrechterhaltung der Gelenkentzündung und tragen damit zur Chronizität und Schwere der RA bei.

5. Die neu gebildeten Immunzellen können erneut in die Synovialflüssigkeit von entzündeten Geweben gelangen und der Kreislauf wiederholt sich/verstärkt sich selbst.^[104]



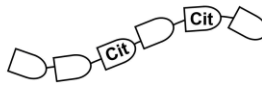
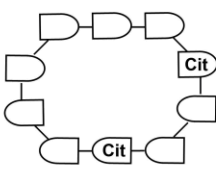

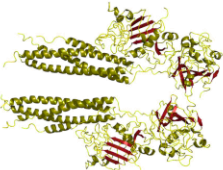
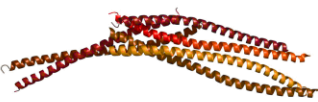
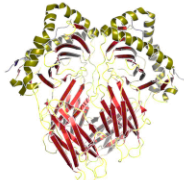
Wiederholt sich dieser Kreislauf über Jahre und wird von neuen Traumata oder anderen Umwelteinflüssen, die Entzündungen stimulieren, begleitet, dann entsteht eine chronische Entzündung, die medizinisch als RA bekannt ist.

1.4.1 Die serologische Diagnostik der rheumatoiden Arthritis

Im vorhergehenden Kapitel wurde erklärt, wie der sich selbst verstärkende Entzündungskreislauf der RA zur Generierung einer Vielzahl von citrullinierten Antigenen und zugehöriger Antikörpern (ACPAs, engl.: *anti-citrullinated peptide antibodies*, dt. Antikörper gegen citrullinierte Peptide) führt. Die serologische Diagnostik der RA beginnt jedoch bereits 1922 vor der Entdeckung dieser citrullinierten Spezies mit den sogenannten Rheumafaktoren, Antikörper der Klasse IgM.^[105] Sie können mit dem konstanten Bereich von humanen IgG-Antikörpern nachgewiesen werden, besitzen jedoch eine eingeschränkte Spezifität und Sensitivität, da sie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen auftreten. Bessere Ergebnisse wurden mit den eben erwähnten ACPAs erzielt.^[91] Cyclische Derivate (CCP, *cyclic citrullinated peptides*) zeigen dabei sogar höhere serologische Spezifitäten.^[84]

Als citrullinierte Antigene wurden bisher verschiedenste Proteine und deren Peptidfragmente identifiziert: 1979 wurden Anti-Keratin-Antikörper identifiziert, wobei das strukturbildende Protein Filaggrin das Zielantigen darstellt.^[106,107] Diese Tatsache konnte bezüglich des Krankheitsverlaufs vorerst nicht gedeutet werden, da Filaggrin weder in Gelenken noch anderen Organen exprimiert wird. SCHELLEKENS *et al.* konnten jedoch zeigen, dass nur citrullinierte Filaggrinsequenzen erkannt werden, sodass zumindest ein Zusammenhang zwischen unkontrolliertem Zelltod und Citrullinierung hergestellt werden konnte.^[92] Da Filaggrin in reiner Form nur schwierig isolierbar ist, verwendete man nur diejenigen Sequenzabschnitte in linearer Form, die als citrullinierte Epitope erkannt worden waren. Eine erhöhte Spezifität konnte anschließend durch Zyklisierung dieser Epitope über Disulfidbrücken erreicht werden.^[84] Mit diese zyklischen citrullinierten Peptiden (CCP, *cyclic citrullinated peptides*) konnte die Spezifität nochmals deutlich erhöht werden. Mittlerweile werden CCPs routinemäßig in der RA-Diagnostik eingesetzt.

Tabelle 1.2. Übersicht über die verschiedenen RA-Autoantikörper und ihre Antigene.^[91,108,109] Die Abbildungen der Proteinstrukturen sind der *Protein Data Bank* (PDB) entnommen (Fibrinogen: 1fza^[110], Vimentin: 1gk4^[111], α -Enolase: 5JLZ^[112]).

Antikörper	Antigen	Diagnostische Sensitivität	Diagnostische Spezifität
 Rheumafaktor (IgM)	 Fc-Bereich des humanen IgG-Antikörpers	60-80%	79%
<hr/>			
	 lineare citrullinierte Filaggrin-Peptide	65-70%	85%
	 cyclische citrullinierte Peptide	65-70%	96-98%
 Antikörper gegen citrullinierte Peptide (ACPA, IgG)	 lineare citrullinierte Fibrinogen-Peptide	75%	98%
	 Mutiertes Citrulliniertes Vimentin (MCV) - Peptide	70-82%	>98%
	 α -Enolase- Peptide	37%	98%

Das Glykoprotein Fibrinogen^[113] zeigt in seiner citrullinierten Form ebenfalls eine hohe Spezifität und Sensitivität für die RA. Mit geringerer Sensitivität aber ebenso hoher Spezifität konnten citrullinierte Derivate des glykolytischen Enzyms α -Enolase in Patienten festgestellt werden.^[108,114] Das im Synovialgewebe exprimierte Intermediärfilament Vimentin konnte als relevantes, citrullinhaltiges Autoantigen für den bereits zuvor bekannten anti-Sa-Antikörper identifiziert werden (nach SAVOIE, dem Namen des ersten Patienten).^[115,116] Weitere Modifikationen führten zu mutiertem citrulliniertem Vimentin (MCV), das in verschiedenen Studien eine vergleichbare Spezifität und Sensitivität wie Anti-CCP-Antikörper aufweist.^[117–119] In Tabelle 1.2 sind die wichtigsten Autoantigen-Autoantikörper-Paare mit serologischer Spezifität und Sensitivität zusammengefasst.

Ein interessanter Befund der letzten Jahre sind Antikörper, die nicht Citrullin erkennen, sondern dessen höheres Homologe Homocitrullin (Hci), das eine zusätzliche Methylengruppe in der Seitenkette enthält.^[120,121] Da Hci im Organismus durch nicht-enzymatische Carbamylierung von Lysin entsteht (Abbildung 1.13), wurden die entsprechenden Antikörper Anti-CarP-Antikörper (*carbamylated protein*) getauft.^[122] Dabei reagiert das Seitenkettenamin mit Cyanat, das zuvor aus Thiocyanat und Wasserstoffperoxid vom Enzym Myelinperoxidase (MPO) *in vivo* gebildet wurde.^[122] MPO steht seit einiger Zeit im Verdacht, auslösender Faktor für Entzündungsprozesse zu sein.^[123]

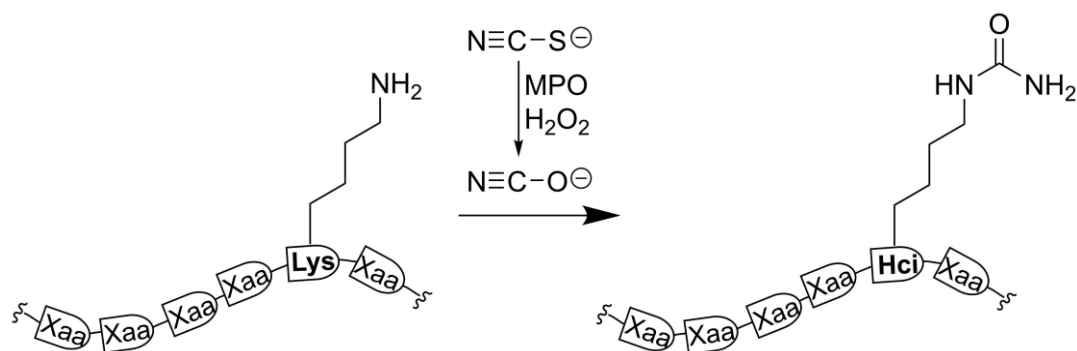


Abbildung 1.13. Nicht-enzymatische Carbamylierung einer Lysinseitenkette zu Homocitrullin (Hci) *in vivo*. Der Prozess kann von der Myelinperoxidase (MPO) vermittelt werden, das unter H_2O_2 -Anwesenheit Isocyanat aus Thioisocyanat herstellt, welches anschließend mit der freien Amingruppe des Lys reagiert.^[122]

Kommerzielle Tests sind auf Basis des Rheumafaktors, der CCPs und des mutierten citrullinierten Vimentins erhältlich.^[91] Auch sogenannte *Point-of-Care*-Tests (patientennahe Labordiagnostik), die in Arztpraxen und Apotheken einfach durchführbar sind, gibt es mittlerweile auf dem Markt. Trotzdem werden Sensitivitäten von mehr als 70% meist nicht

erreicht (abhängig von individuellen Unterschieden in Patientenkohorten).^[109,124] Auf Grundlage der Vielzahl von Autoantikörpern gegen citrullinierte Antigene besteht die Aufgabe also darin, neue komplementäre Autoantikörper und deren Antigene zu entdecken, zu charakterisieren, zu modifizieren und deren diagnostische Eigenschaften zu verbessern. Dabei stellt sich die Frage, ob das Maximum an Sensitivität und Selektivität schon erreicht ist, oder ob weitere, ergänzende Methoden für die detailliertere Suche bisher nicht berücksichtigt wurden und weitere Autoantikörper existieren. Das langfristige Ziel soll dabei eine personalisierte Diagnose zur Charakterisierung von Autoantikörperprofilen sein.^[125–127]

1.5 D-Aminosäuren in Peptiden - Die Erweiterung des Alphabets

Über das Design von Peptiden, insbesondere in Form von β -*hairpins*, und deren Rolle als Epitope in der Autoimmundiagnostik wurde in den vorangegangenen Kapiteln berichtet. Eine Methodik, deren konformationellen Raum zu beeinflussen und erforschen, stellt der Einsatz von D-Aminosäuren dar. Diese beeinflussen nämlich ausschließlich die Konformation des Peptids, während die chemische Funktionalität unangetastet bleibt. Gleichzeitig erhöhen sie als nicht-proteinogene Enantiomere die *in-vivo*-Stabilität der Peptide.^[128]

Im Jahr 1941 veröffentlichten LIPMANN und Kollegen eine Studie über das Vorkommen von D-Aminosäuren in Gramicidinen und Tyrocidinen, womit die Forschung auf dem Feld der D-Aminosäure-haltigen Peptide beginnt.^[129,130] Die Einführung solcher Aminosäuren verläuft in Organismen in einigen Fällen über eine posttranslationale Epimerisierung,^[131] so zum Beispiel bei Opioidpeptiden aus der Haut verschiedener Froschspezies, Dermorphine und Deltorphine genannt,^[132] oder bei Contryphanen, D-Tryptophan-haltigen Peptiden aus Kegelschnecken.^[133] Auf chemisch-synthetischem Wege können D-Aminosäuren als entsprechend geschützte Derivate in der Peptidfestphasensynthese eingebracht werden. Um den Effekt zu verstehen, den D-Aminosäuren auf die Konformation eines Peptids haben, lohnt sich eine Betrachtung der RAMACHANDRAN-Plots von L-Alanin und D-Alanin, wie sie in Abbildung 1.14 gezeigt sind.^[130,134] Die Auftragung der erlaubten ϕ - und ψ -Winkel einer D-Aminosäure entspricht dabei derjenigen des L-Alanins mit Punktspiegelung um den Ursprung. Die meisten Regionen, die für L-Aminosäuren stereochemisch erlaubt sind, umfassen negative ϕ -Winkel. D-konfigurierte Bausteine dagegen nehmen bevorzugt positive ϕ -Werte an. Während L-Aminosäuren Helices mit rechtsgängiger Verdrillung ausbilden, formen ihre D-konfigurierten Gegenstücke linksgängige Helices. Diese entgegengesetzten Eigenschaften erklären, warum D-

Aminosäuren in ansonsten L-konfigurierten Peptiden die Konformation destabilisieren oder gar zerstören.^[135,136]

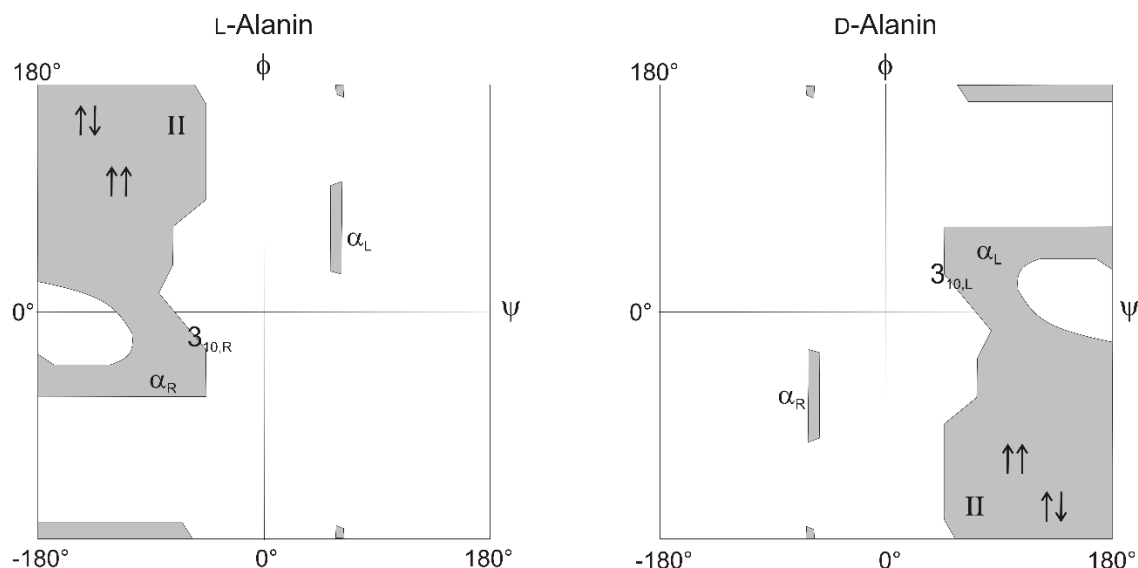


Abbildung 1.14. Vergleich der RAMACHANDRAN-Plots von L- und D-Alanin mit den jeweils erlaubten ϕ - und ψ -Winkel-Kombinationen (Index R: rechtsgängig, Index L: linksgängig, II: Polyprolin-II-Helix).^[130,134]

Nichtsdestotrotz werden D-Aminosäuren für das Design von (β -*hairpin*-) Peptiden gezielt eingesetzt.^[130] So spielt das D-Pro-Xaa-Motiv (vor allem Xaa: L-Pro, Gly, siehe auch Kapitel 1.2) eine wichtige Rolle als *turn*-induzierendes Dipeptid.^[37,39,137] Das Resultat sind dabei meist *turns* des Typs II'. Mehrfacher Einbau einer solchen Sequenz kann zur Nukleation von drei oder mehr β -Strängen verwendet werden.^[138–141] Das Segment Aib-D-Ala wurde dagegen eingesetzt, um einen *turn* des Typs I' zu induzieren.^[142] Dipeptidbausteine, die D-Aminosäuren enthalten, können also gezielt zur Induktion gewünschter *turns* verwendet werden, wobei diese Modifikationen nicht die tatsächlichen β -*sheet*-Sekundärstrukturbereiche des *hairpins* betreffen.

DURANI *et al.* entwickelten in dieser Hinsicht einige Peptide am Computer, die ausgehend von einem β -*hairpin* unter Einsatz von D-Aminosäuren spezifische Faltungen (*bracelet*,^[143] *boat*,^[144] *canoe*,^[145] π -*cup*,^[146] siehe Abbildung 1.15) hervorbringen sollen. Dabei werden D-Aminosäuren auf direkt gegenüberliegenden Positionen der antiparallelen β -Stränge eingebracht. Das langfristige Ziel ist die Nachbildung von Rezeptor-ähnlichen Faltungen bzw. Enzym-Mimetika.^[147,148]



Abbildung 1.15. Ausgehend von einer β -hairpin-Struktur reprogrammieren DURANI *et al.* die Faltung mit D-Aminosäuren so, dass die gezeigten Formen entstehen sollen.^[149] Kugeln stellen dabei jeweils Aminosäurepositionen dar, wobei graue Kugeln L- und rote Kugeln D-Aminosäuren repräsentieren.

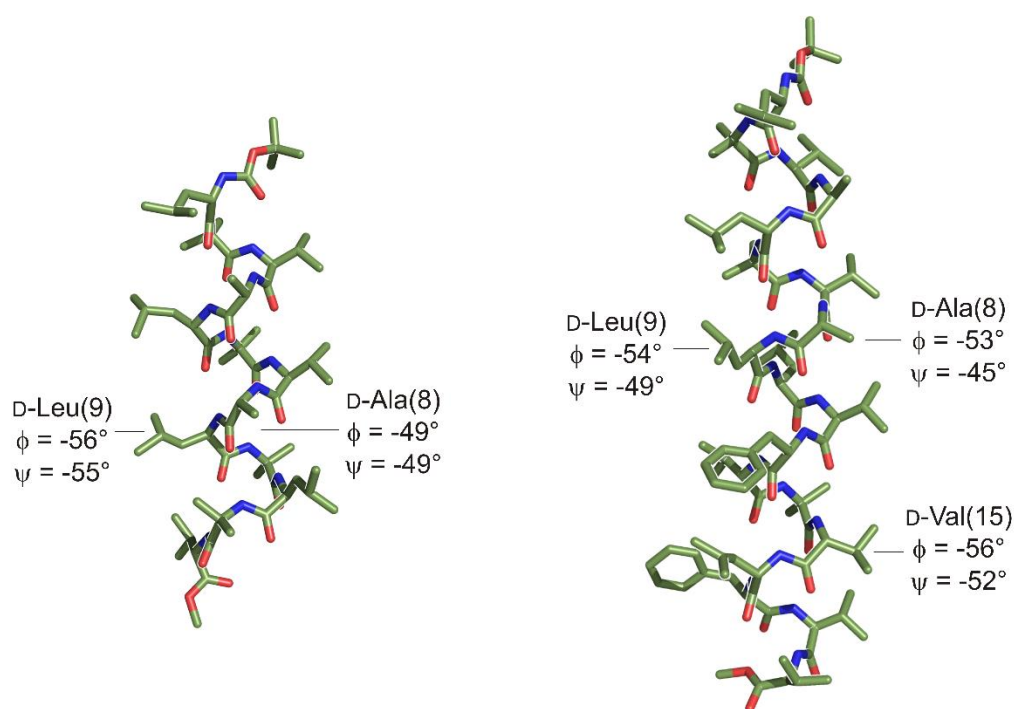


Abbildung 1.16. Kristallstrukturen von rechtsgängigen α -Helices, die zwei D-Aminosäuren (links)^[150] oder drei D-Aminosäuren (rechts)^[151] enthalten. Die relevanten ϕ - und ψ -Winkel sind an der jeweiligen Aminosäure verzeichnet und weisen auf eine α_R -Winkel (vgl. RAMACHANDRAN-Plot in Abbildung 1.14).

Jenseits von β -*hairpin*-Peptiden sind Beispiele für die Inkorporation von einzelnen D-Aminosäuren in rechtsgängige L- α -Helices bekannt. Letztere sind weit verbreitete Sekundärstruktur motive und haben dementsprechend eine hohe biologische Relevanz. Die Einführung von D-konfigurierten Bausteinen erhöht, wie bereits erwähnt, die Stabilität des Peptids gegenüber Enzymen.^[128] Sie sollte auf Grundlage des in Abbildung 1.14 gezeigten RAMACHANDRAN-Plots auch möglich sein, da α_R -Winkelkombinationen eingenommen werden können, wenn es sich dabei auch nur um eine sehr schmales Fenster handelt.^[130] Unter Erhalt der biologisch bedeutsamen Vorzugskonformation muss die Position der Mutation dennoch sorgfältig gewählt werden. FAIRMAN und Kollegen haben die energetische Einbuße auf etwa 0.95 kcal/mol für D-Alanin im Vergleich zu L-Alanin in rechtsgängigen helikalen Strukturen beziffert.^[152] Unter Substitution ausgewählter Helix-Positionen ist es BALARAM *et al.* gelungen eine (D-Ala),^[153] zwei zentrale (D-Ala-D-Leu)^[150] oder sogar drei D-Aminosäuren^[151] ohne signifikante Beeinflussung der Sekundärstruktur einzubringen. Die Kristallstrukturen der beiden letztgenannten Spezies sind in Abbildung 1.16 dargestellt, wobei die *backbone*-Diederwinkel, die die D-Aminosäuren einnehmen, eingetragen sind. Sie korrelieren eindeutig mit einer rechtsgängig α -helikalen Ausrichtung.

Der Vollständigkeit halber sollen hier noch gemischte L/D-Peptide, die alternierend aus L- bzw. D-Aminosäuren bestehen, diskutiert werden. Diese bilden sogenannte π_{LD} -Helix-Konformationen aus, die als sich wiederholende L/D-Dipeptideinheiten mit β -*sheet*-Winkelkombinationen auf jeweils entgegengesetzten Seiten des ϕ/ψ -Plots beschrieben werden können. Die dabei entstehenden helikalen Strukturen sind durch parallele β -*sheet*-Wasserstoffbrücken zwischen direkt benachbarten Segmenten stabilisiert.^[154] Ein bekanntes Beispiel für eine solche Sequenz ist Gramicidin A, ein lineares Pentadecapeptid, das weitporige Helices ausbildet.^[155,156] Interessanterweise unterscheiden sich dabei die NMR-Daten, die auf die genannte π_{LD} -Helix hinweisen, von der Kristallstruktur, welche eine antiparallele Doppelhelix darstellt (Abbildung 1.17, links). Ein weiteres Beispiel für eine solche bemerkenswerte Struktur ist das 13 Aminosäure umfassende Peptid Feglymycin, welches zu einem Großteil aus den ungewöhnlichen Aminosäuren Mpg (4-Monohydroxyphenylglycin) und Dpg (3,5-Dihydroxyphenylglycin) in L- und D-Form besteht (Abbildung 1.17, rechts).^[157] Die Gemeinsamkeit dieser Peptide liegt in der Ausbildung von Ionenkanälen.

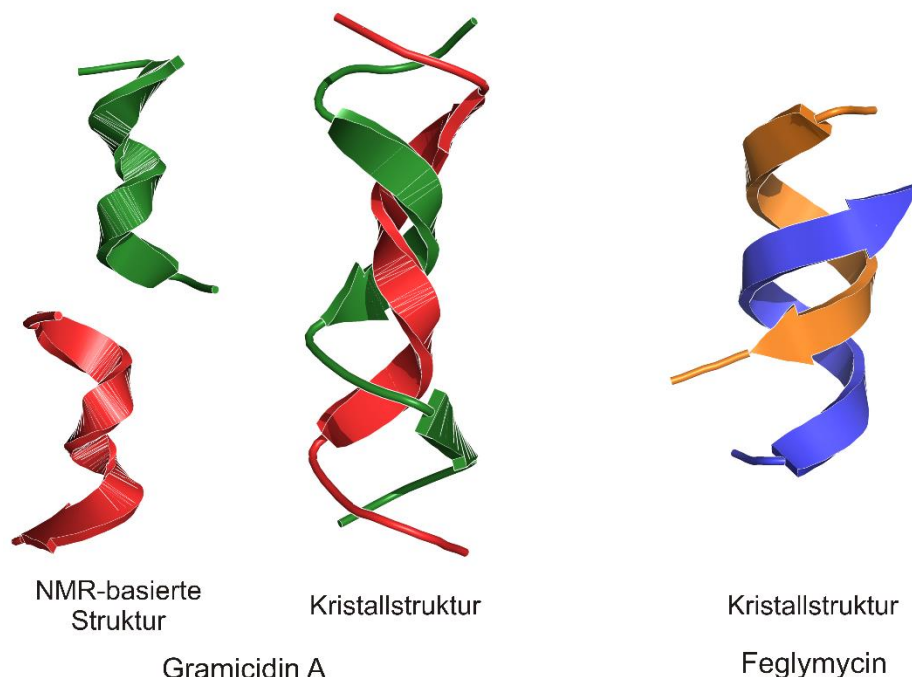


Abbildung 1.17. NMR-basierte^[158] und Kristallstruktur^[159] von Gramicidin A (links, Sequenz: VGAlAvVv(Wl)₃W) und Kristallstruktur von Feglymycin^[157] (rechts, Sequenz: mpg-dpg-V-dpg-Mpg-dpg-Mpg-dpg-V-dpg-Mpg-F-D, Mpg = 4-Hydrophenylglycin, Dpg = 3,5-Dihydroxyphenylglycin).

Alle genannten Beispiele zeigen, dass D-Aminosäuren wichtige und interessante Bausteine für Peptide sind, mit denen sich die Konformation von ansonsten L-konfigurierten Biomolekülen gezielt verändern lassen und eine erhöhte Proteolyse-Stabilität erreicht werden kann. Die Mutationspositionen müssen jedoch sorgfältig ausgewählt werden, sodass die ungewöhnlichen bzw. unpassenden ϕ - und ψ -Winkelkombinationen kompensiert werden können (bspw. durch räumlich korrelierte Mutationen oder die gezielte Ausnutzung des gesamten, durch den RAMACHANDRAN-Plot wiedergegebenen konformationellen Raum). So lässt sich das Aminosäurealphabet mit diesen 'Kleinbuchstaben' auf äußerst nützliche Art und Weise erweitern.

1.6 Disulfidreiche Peptide

Eines der vielseitigsten und wichtigsten Struktur motive in Peptiden sind Disulfide. Sie schränken die Beweglichkeit der Biomoleküle ein und sind in deren oxidative Faltung sowie konformationelle Stabilisierung eingebunden. Kleine, disulfidreiche Architekturen spielen eine immer größere Rolle als privilegierte Strukturen mit vielversprechenden pharmakologischen Eigenschaften im Wirkstoffdesign.^[160,161] Einige befinden sich zurzeit in klinischen Studien, andere sind bereits zugelassene Medikamente.^[161–164]

Die Synthese von derartigen Gerüsten im Labor stellt eine hohe chemisch-synthetische Herausforderung an den Experimentator.^[165–168] Die regioselektive Cystin-Bildung in Peptiden bzw. Proteinen verläuft über einen komplexen Pfad der oxidativen Faltung, wobei aus einem reduzierten, ungefalteten Oligothiols ein oxidiertes, gefaltetes Oligodisulfid entsteht.^[169] Disulfidisomerasen und andere Chaperone unterstützen diesen Prozess in lebenden Organismen, sodass die dreidimensionale Struktur des Biomoleküls eingeschränkt und gefestigt wird. Die daraus resultierende erhöhte Proteolysestabilität geht mit einer selektiven biologischen Aktivität einher.^[165] In der Natur hat sich eine definierte Zahl an hochkomplexen Faltungen entwickelt (Abbildung 1.18), darunter prominente Beispiele wie Defensine, Toxine und Cyclotide.^[170,171]

Darüber hinaus ist Cystein in der Lage Metallionen oder Eisen-Schwefel-Cluster zu binden, eine überlebenswichtige Eigenschaft, um Redoxprozesse in Organismen durchzuführen und zu kontrollieren.^[172–174] Die Anzahl an möglichen Disulfid-Konnektivitäten steigt exponentiell mit der Anzahl an Thiolen im Molekül. Aufgrund der daraus resultierenden Fülle an isomeren Strukturen und der Komplexität des oxidativen Faltungsprozesses stellt das *de-novo*-Design nicht-natürlicher Oligo-Disulfide und Metall-bindender Oligothiols eine große Herausforderung dar.^[175,176]

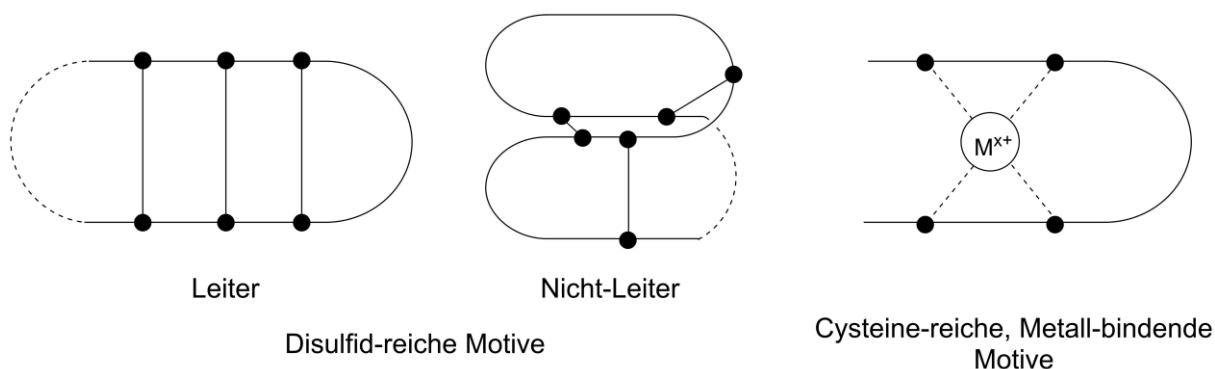


Abbildung 1.18. Vereinfachte Darstellung von monomeren, intramolekular oxidierten disulfidreichen Peptiden und deren Verknüpfungsmuster (die fetten Punkte entsprechen Cysteinen). Das Leitermotiv (links, engl. *ladder*) kommt bspw. in θ -Defensinen, Tachyplesin oder als Teil der *hinge*-Region von IgG-Antikörpern vor. Jenseits dieses Leitermotivs bilden Peptide hochkomplexe Faltungsgeometrien aus (Mitte). Metall-bindende Motive (rechts) umfassen zwischen zwei und vier Cysteinen und binden Metalle oder Fe/S-Cluster.^[177]

1.6.1 Synthesemethoden für disulfidreiche Peptide

Um die zuvor genannten Herausforderungen der regioselektiven Cystinbildung (für zwei oder mehr Disulfidbrücken) zu adressieren, gibt es verschiedene Lösungsansätze. Im Idealfall werden in Lösung alle Cysteine gleichzeitig zur Oxidation gebracht, wobei die gewünschte Topologie zumindest als Hauptprodukt entsteht. Dabei spielt die konformationelle Vororientierung des Peptids die entscheidende Rolle für die Ausbildung nativer Disulfidbrücken.^[178,179] Gleichzeitig wird das Oxidationsverhalten von den Bedingungen in Lösung wie Lösungsmittel, pH-Wert, Temperatur, Konzentration, Ionenstärke, Oxidationszusätze und Kosolvenzien stark beeinflusst. Beispiele für disulfidreiche Peptide, die bei direkter Oxidation aller Thiole Hauptprodukte ausbilden, sind das BPTI (*bovine pancreas trypsin inhibitor*),^[180,181] Apamin^[182,183] oder verschiedene Conotoxine.^[184]

Meistens besteht jedoch die Notwendigkeit, die jeweiligen Cysteinpaare mit orthogonalen Schutzgruppen zu versehen, um sie nacheinander zu entschützen und zum jeweils gewünschten Disulfid reagieren zu lassen. Abbildung 1.19 gibt einen repräsentativen Überblick über die Strategie und eingesetzte Cysteinschutzgruppen, die sich orthogonal zueinander abspalten lassen.^[185,186] Diese Auswahl lässt sich für verschiedenste Zwecke beliebig erweitern und bietet dementsprechend ein großes, flexibles Arsenal an chemisch-synthetischen Alternativen. Gleichzeitig sind derartige Synthesen aufwendig und das Auftreten von Nebenreaktionen bei den jeweiligen EntschützungsSchritten kann die Produktreinheit deutlich verringern.

Jenseits dieser aufwendigeren Schutzgruppenstrategien wurden weitere Methoden entwickelt, um selektiv Disulfidbrücken ausbilden zu können. WU und Mitarbeiter fanden heraus, dass sich das Heterodisulfid aus Cystein und Penicillamin (Pen) selektiv und damit orthogonal zu den jeweiligen Homodisulfiden ausbildet, wobei keine zusätzlichen Schutzgruppen benötigt werden.^[187] Die Ausbildung des Pen-Pen-Homodisulfids verläuft aufgrund der sterischen Hinderung der beiden Methylgruppen am C β des Penicillamins langsam, die von Cys-Cys jedoch schnell. Unter Disulfid-*shuffling* entsteht im Gleichgewicht dann das Heterodisulfid Cys-Pen (siehe Abbildung 1.20A, links).

Eine andere Route wählte die Arbeitsgruppe um GAUTHIER: Sie entdeckten, dass eine regioselektive Paarung von intra- und intermolekularen Disulfiden mit dem CXC-Motiv möglich ist (Abbildung 1.20B, rechts).^[188] Die dabei entstehenden Bidisulfide nennen sie *twinned disulfides*. Auch diese Methodik kommt ohne zusätzliche Schützungen der Cysteine aus und kann in Anwesenheit weiterer Cysteine durchgeführt werden.

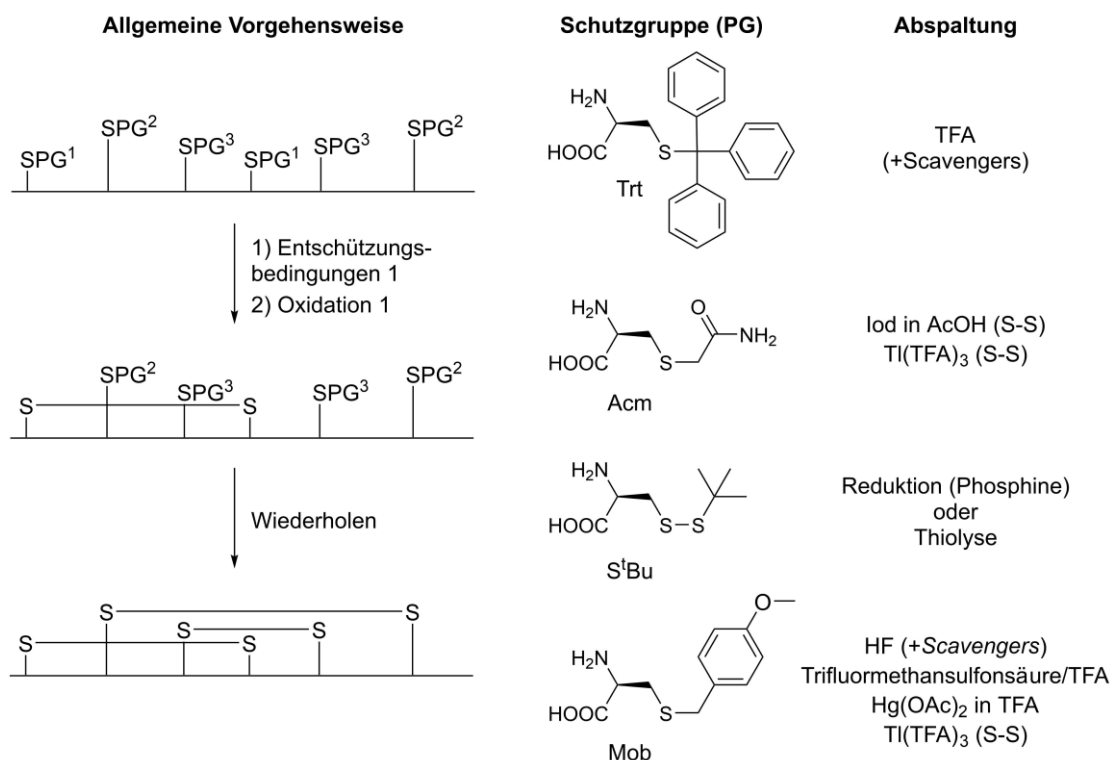


Abbildung 1.19. Um regioselektiv Disulfide ausbilden zu können, bedient man sich orthogonaler Schutzgruppen (PG) für die entsprechenden Cysteinpaare, die man zuerst unter bestimmten Bedingungen einzeln abspalten kann, um dann das frei gewordene Cys-Paar zu oxidieren (links). Eine repräsentative Auswahl an Schutzgruppen (Trt: Trityl, Acm: Acetamidomethyl, S^tBu: *tert*-Butylsulfanyl, Mob: 4-Methoxybenzyl) ist mitsamt der Abspaltbedingungen abgebildet (S-S: Das Disulfid bildet sich bereits unter den Entschützungsbedingungen aus).^[186]

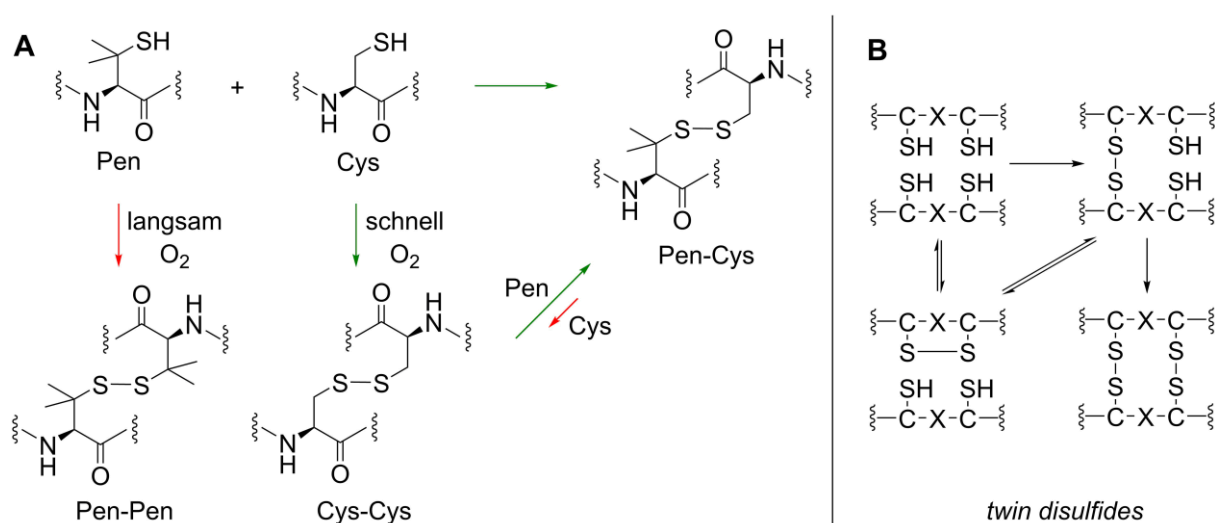


Abbildung 1.20. Chemoselektive Heterodisulfid-Bildung von Cystein und Penicillamin (Pen, **A**)^[187] und Bidisulfid-Paarung von CXC-*twin*-Disulfiden (**B**)^[188] als Methoden zur regioselektiven Ausbildung von Disulfiden ohne Einsatz von orthogonalen Cys-Schutzgruppen.

Anstelle von Disulfiden können sich Diselenide als nützlich erweisen. Es ist bekannt, dass letztere nur mit relativ starken Dithiol-Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT) in wässriger Lösung (pH 7.6) reduziert werden können,^[189] und nicht einfach durch Monothiole.^[190] Die unterschiedlichen Redoxpotentiale sorgen darüber hinaus dafür, dass die Bildung von Diselenidbrücken aus Selenocystein (Sec) gegenüber derjenigen von gemischten Selenid-/Sulfidbrücken begünstigt ist.^[166,191–193] Dementsprechend wurden Selenocysteine eingesetzt, um bei geeigneter, isosterer Cystein-Substitution innerhalb der Peptidsequenz die korrekte oxidative Faltung von disulfidreichen Peptiden zu lenken.^[194–196]

Eine weitere interessante Anwendung, die sich die Chemoselektivität von Selenocysteinen zunutze macht, ist das Festhalten von Faltungsintermediaten, um den Faltungsweg des Peptids analysieren zu können.^[183,197] Dazu werden in disulfidreichen Peptiden Cysteinpaare, durch ihr Selen-Analogon ersetzt und das Diselenid ausgebildet. Anschließend können die S^tBu-geschützten Cysteine mit Phosphinen entschützt werden (vgl. Abbildung 1.19). Die dabei entstehenden Topologien entsprechen potentiellen Faltungsintermediaten und deren Vorzugskonformationen, die mittels (NMR-)spektroskopischen Methoden analysiert werden. So können Hinweise auf den Faltungspfad des Biomoleküls gefunden werden. In Abbildung 1.21 ist diese Vorgehensweise schematisch am Beispiel des Apamins, wie es von MORODER *et al.* untersucht wurde, dargestellt.^[183,197]

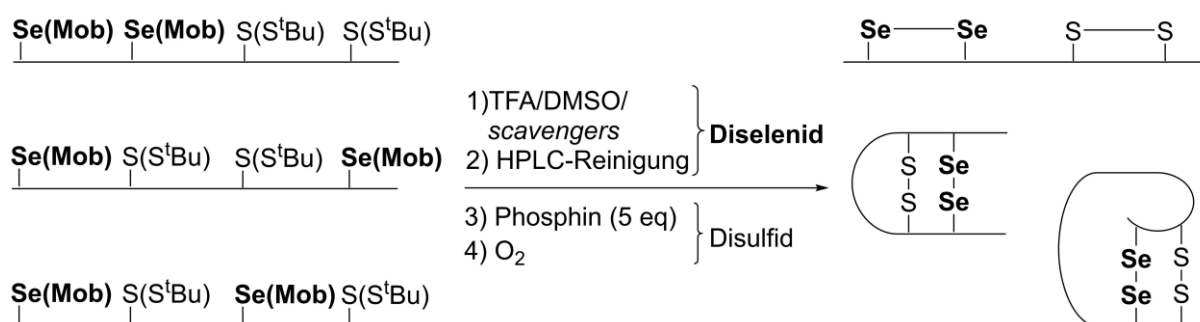


Abbildung 1.21. Regioselektive Selenocystein- (Sec) und Cystinbildung (Cys) nach MORODER *et al.*^[183,197] Am Beispiel des Apamin wurden verschiedene Sec- und Cys-Paare synthetisiert, wobei immer zuerst regioselektiv das Diselenid ausgebildet und somit eine bestimmte Topologie vorgeformt wird (rechts). Abschließende Reduktion der Cys(S^tBu)-Disulfide und Luftoxidation zum Disulfid führt zum gewünschten analysierbaren Isomer (S^tBu: *tert*-Butylsulfanyl, Mob: 4-Methoxybenzyl).

1.6.2 Disulfidreiche Dimere

Die bisher diskutierten Synthesestrategien können nicht nur angewendet werden, um innerhalb desselben Peptidstrangs die korrekte Disulfidverknüpfung zu erhalten, sondern auch um Dimere (oder Oligomere) auszubilden. Hier kommt außerdem die Tatsache zum Tragen, dass eine Dimer-gegenüber einer Monomerbildung entropisch ungünstig ist, was das gezielte Design zusätzlich erschwert. Abbildung 1.22 zeigt drei mögliche C_2 -symmetrische Dimer-Verknüpfungsmuster (in Anlehnung an die monomeren Faltungen aus Abbildung 1.18). Natürlich können auch hier beliebig komplexe Faltungsmuster (Leiter, Knoten etc.) entstehen bzw. miteinander verknüpft werden.

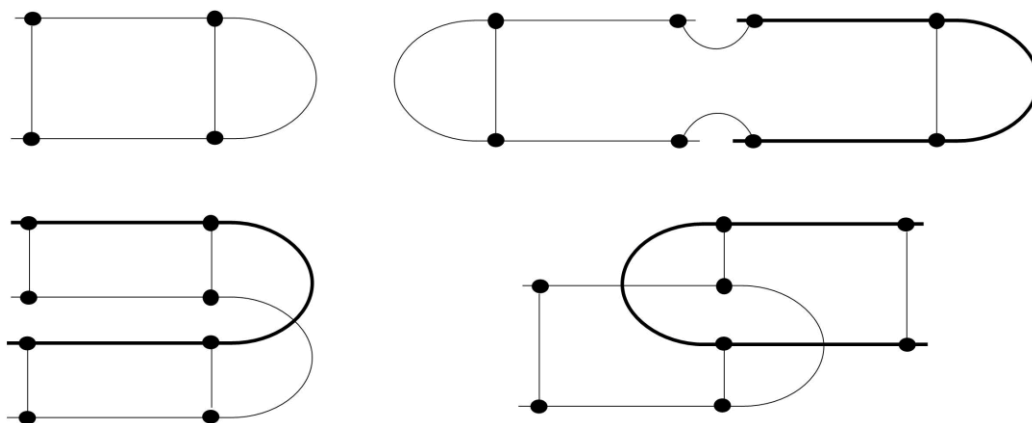


Abbildung 1.22. Vereinfachte Darstellung eines monomeren Bidisulfids (oben links) und mögliche C_2 -symmetrische Tetradisulfid-Homodimere mit unterschiedlichen Verknüpfungsmustern (die Punkte entsprechen Cysteinen).^[177]

Mit orthogonalen Schutzgruppen wurden Disulfid-verbrückte Dimere beispielsweise von Defensinen oder Magainin hergestellt.^[198–200] Gute Ergebnisse für die Dimerisierung ohne zusätzliche Schutzgruppen wurden dabei vor allem mit den Synthesestrategien erzielt, die in Abbildung 1.20 gezeigt sind und keine zusätzlichen Schutzgruppen benötigen, nämlich die Pen-Cys-Heterodisulfide^[187] und die CXC-*twin*-Disulfide.^[188] Eine interessante Strategie stellt die Ausnutzung hydrophober Kontaktflächen zur Dimerisierung dar: Dabei wurden paarweise Aminosäuren in der entsprechenden Kontaktfläche einer α -Helix durch Cysteine ausgetauscht, um anschließend über dementsprechend zwei Disulfide intermolekular Helix-Dimere auszubilden.^[201,202] Dadurch wurde die biologische Aktivität einerseits als auch die proteolytische Stabilität andererseits verbessert. NOLAN und Mitarbeiter beschreiben einen C_2 -symmetrischen β -sheet-Zylinder, der durch Luftoxidation ausgehend von einem natürlich

vorkommenden α -Defensin-Monomer (32 Aminosäuren, sechs Thiole) ein isolierbares Dimer-Hauptprodukt (64 Aminosäuren, sechs Disulfide) bildet (Abbildung 1.23A).^[203] Bei diesen disulfidreichen Strukturen handelt es sich um evolutionär optimierte Miniproteine und die Ergebnisse von NOLAN werfen die Frage nach der Rolle solcher Dimere in der Natur auf, wo sie dementsprechend auch vorkommen (LIU *et al.* erstellten bspw. eine Übersicht für antimikrobielle Peptiddimere^[204]). Das Design von synthetischen, unnatürlichen Oligodisulfiden, die regioselektiv oxidieren, stellt eine hohe synthetische Herausforderung dar. So wurden komplexe Template unter Ausnutzung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen erstellt, um die dynamisch-kovalente Chemie von Disulfiden zu steuern und zu untersuchen.^[205] Diese Template werden ausgehend von symmetrischen Monomerbausteinen erzeugt, auf die diese Art der supramolekularen Chemie limitiert ist, wobei dynamisch-kombinatorische Molekülbibliotheken (im Fall der Disulfide also verschiedene oligomere Spezies) entstehen. In Abbildung 1.23B ist ein solches Beispiel der Arbeitsgruppe um SANDERS zu sehen, das sowohl Monomere als auch Dimere unter Luftoxidation in wässriger Lösung ausbildet.^[206]

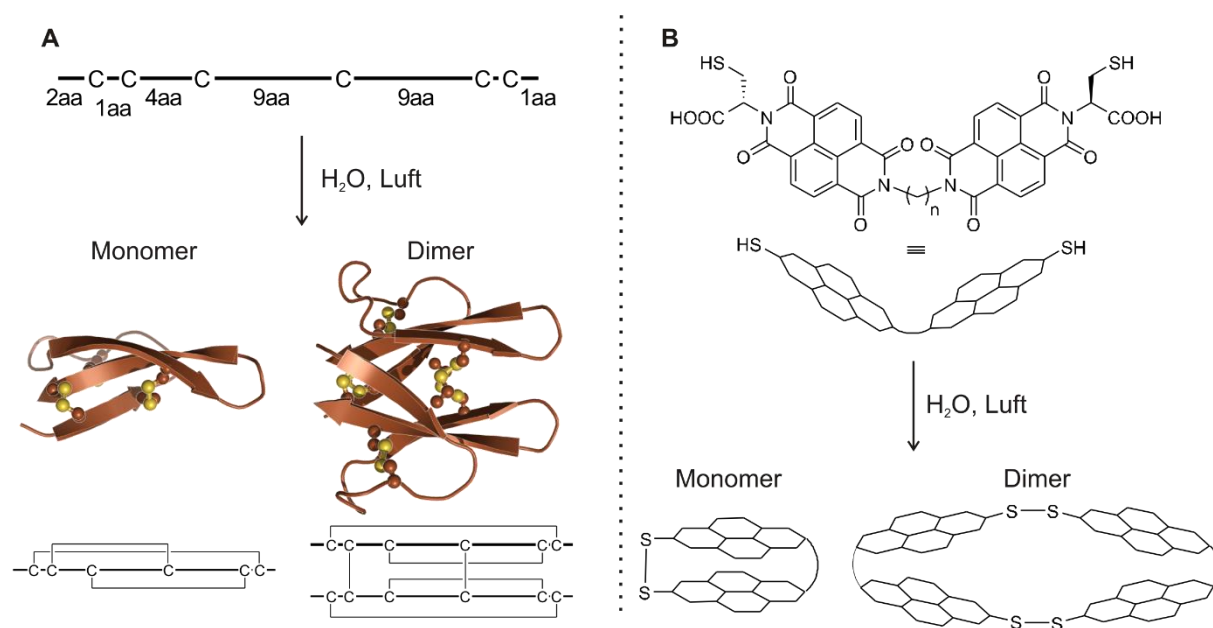


Abbildung 1.23. A: Beispiel für eine evolutionär optimierte Peptidsequenz, die in wässriger Lösung in Anwesenheit von Luft zu Monomeren (Tridisulfide) und Dimeren (Hexadisulfide) oxidiert.^[203] B: Synthetische, symmetrische Dithiol-Monomereinheit, die ebenfalls in wässriger Lösung zu Monomeren (Monodisulfide) und Dimeren (Bidisulfide) oxidiert wird (je nach Anzahl n der Methylengruppen im Dithiol wurden auch Catenane beobachtet).^[206]

Eines der bekanntesten Beispiele für die Disulfid-vermittelte Homodimerisierung von Peptiden ist die prolinreiche *hinge*-Region (engl. für Scharnier) von Immunglobulinen (siehe auch Kapitel 1.7.1), durch die die zwei schweren Antikörperketten über mindestens zwei Disulfide (CPPC-Motiv) zum entsprechenden Dimer verknüpft sind.^[207] Darauf basierend wurden *hinge*-Peptide mit und ohne den Einsatz von orthogonalen Cystein-Schutzgruppen synthetisiert (siehe Abbildung 1.24).^[178,208,209] Je nach Oxidationsbedingungen kann das parallele Dimer als Hauptprodukt isoliert und konformationellen Studien unterzogen werden. Dabei wurde eine PP-II-Helix festgestellt, die auch dann erhalten bleibt, wenn IgG-verwandte oder auch nicht verwandte C- und N-terminale Verlängerungen vorgenommen werden.^[210,211]

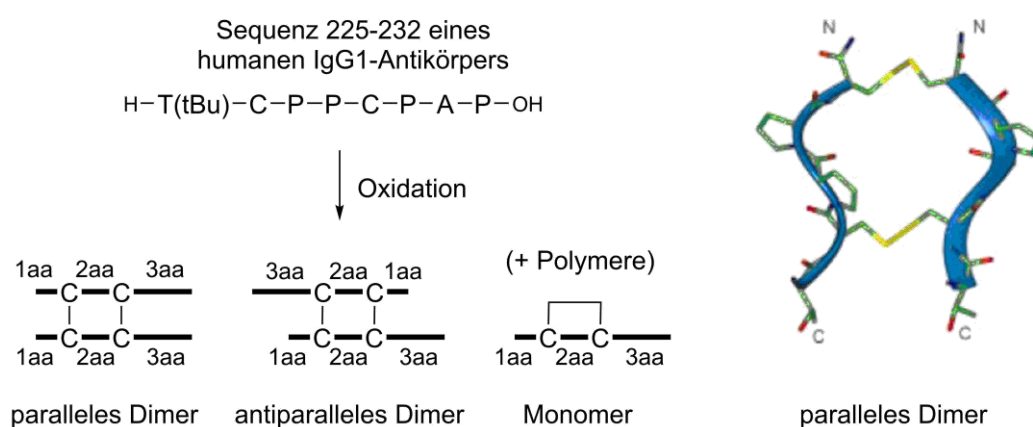


Abbildung 1.24. Die Luftoxidation des *hinge*-Fragments 225-232 eines humanen IgG-Antikörpers führt (je nach Bedingungen) zur hauptsächlichen Bildung des parallelen Dimers. Daneben werden Monomere, antiparallele Dimere und Polymere beobachtet.^[166,208]

1.7 Antikörper und ihre Dynamik

Peptidische Antigene werden von sogenannten Antikörpern oder Immunglobulinen (Ig) gebunden. Das sind Proteine, die vom körpereigenen Immunsystem hergestellt werden, um körperfremde Stoffe, Viren und Bakterien im Blutserum und in Gewebsflüssigkeiten zu bekämpfen (neben anderen Verteidigungsmechanismen).^[212] Es kommen vorwiegend fünf verschiedene Isotypen vor, nämlich IgG, IgM, IgA, IgD und IgE, wobei in diesem Kapitel die in humanem Blutserum hauptsächlich auftretenden IgGs besprochen werden.^[213–215] Dieser besitzt eine Y-förmige Struktur, deren Charakteristika in Abbildung 1.25 abgebildet sind. Es handelt sich um Disulfid-verbrückte Homodimere, wobei sich die Proteinuntereinheiten wiederum aus einer leichten und einer schweren Kette zusammensetzen. Die schwere Kette besitzt drei konstante Bereiche (C_H) und eine variable Region (V_H), während die leichte Kette jeweils einen konstanten (C_L) und einen variablen Abschnitt (V_L) aufweist.

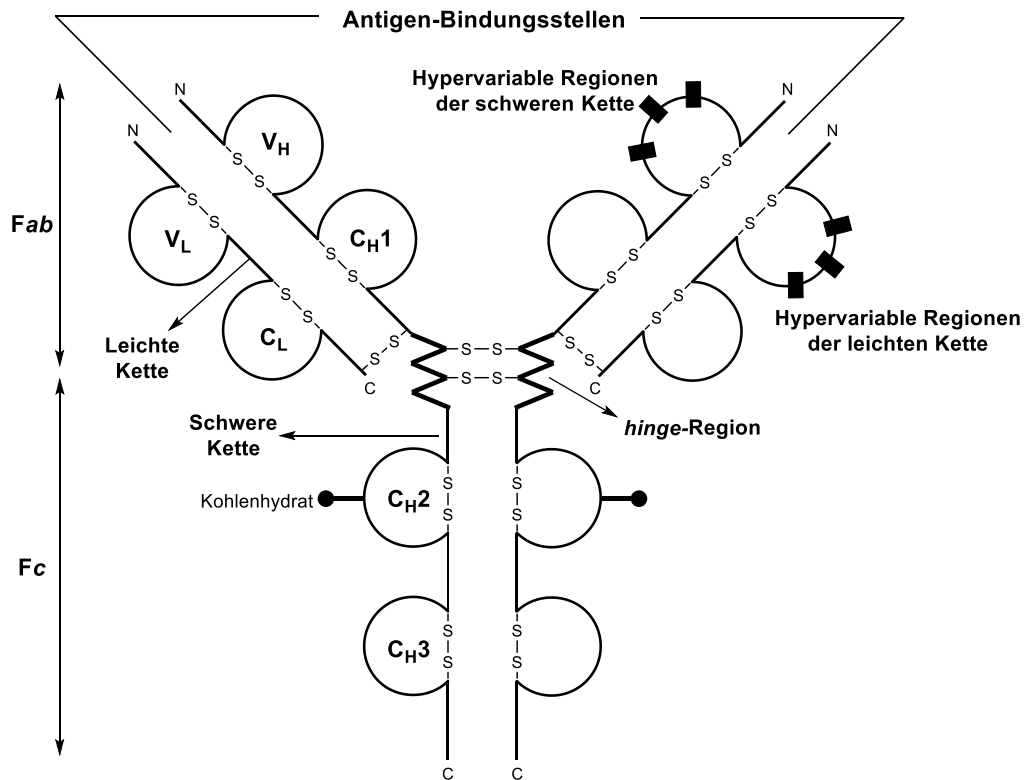


Abbildung 1.25. Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.^[215] Fc: kristallisierbares Fragment; Fab: Antigen-bindendes Fragment.

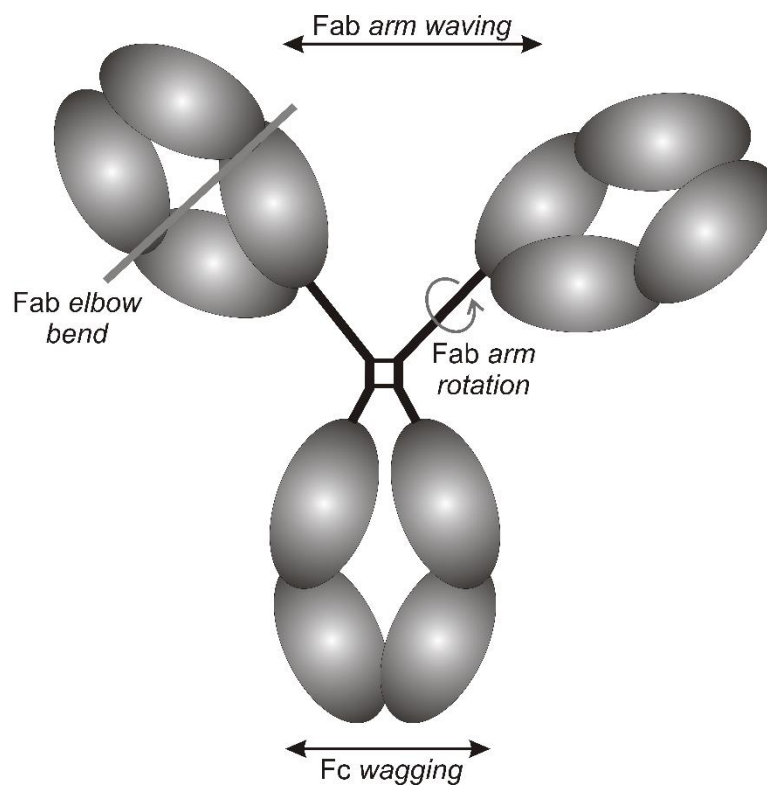


Abbildung 1.26. Die Bewegungsmodi eines IgG-Moleküls.^[216]

Die variablen Bereiche selbst sind tatsächlich nicht über ihre ganze Sequenzlänge durchgängig veränderbar, sondern es gibt jeweils drei sogenannte hypervariable Regionen, die den höchsten Variantenreichtum in Bezug auf Länge und Aminosäurezusammensetzung unter allen IgGs zeigen. Letztere sind dementsprechend auch für die Spezifität der Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen verantwortlich. Dabei wird das Hapten des Epitops durch die hypervariablen Regionen in einer Art Spalt (engl. *crevice*) gebunden, während der Rest des Peptids mit der Antikörperoberfläche wechselwirkt.^[9] Damit besteht eine umfassende, komplementäre Kontaktfläche zwischen dem größten Teil des Epitops und dem Paratop mit einer ähnlich dichten Packung wie das Innere eines gefalteten Proteins.

Antikörper sind keine starren Strukturen, sondern hochflexible Moleküle.^[216–220] Abbildung 1.26 zeigt die verschiedenen Bewegungsmodi, die dabei eine Rolle spielen. Die Fab-Arme können sich wie beim Winken hin- und herbewegen (*waving*), aber auch Rotationen oder Ellenbogenbeugungen (*elbow bending*) am Übergang zwischen den konstanten und variablen Regionen durchführen. Das *wagging* (eine Art Wedelbewegung) des Fc-Teils ist ebenfalls möglich. Solche dynamischen Bewegungen konnten mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, so z. B. über Fluoreszenzpolarisation,^[217] Elektronenmikroskopie,^[218] in Kristallstrukturen^[219] sowie über Cryo-Elektronen-Tomographie.^[220]

Die Beweglichkeit der Antikörper spielt konsequenterweise eine entscheidende Rolle bei der Epitop-Paratop-Erkennung und damit auch für die Frage, welche Konformationen die biologisch aktiven sind.^[221] Eine Studie von TAINER *et al.* verglich dafür anti-Protein-Antikörper (als solche Antikörper, die gegen ein gefaltetes Protein gerichtet sind) und anti-Peptid-Antikörper (die gegen flexiblere Peptide gerichtet sind). Letztere erkennen nicht nur die jeweiligen flexiblen Peptide, sondern auch die wesentlich strukturierteren Proteine, aus denen die Sequenz des Peptids entnommen wurde. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der dynamische Prozess der molekularen Erkennung dann am besten funktioniert, wenn die Konformation und korrelierte Beweglichkeit des Peptid-Immunogens denjenigen des ursprünglichen Proteinepitops entsprechen. Die Mobilität der Moleküle und die daraus resultierenden Konformationen sind also für alle beteiligten Bindungspartner von großer Bedeutung. Mit formstabilen, konformationellen Peptid epitopen, deren Strukturparameter im Detail bekannt sind, lässt sich dementsprechend ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Bindungsmodi erzielen.

1.7.1 Die Antikörper-*hinge*-Region

Die *hinge*- oder auch Scharnier-Region eines Antikörpers verbindet den Fc- mit dem Fab-Teil und ist für die Homodimerisierung der beiden Proteinhälften (im Speziellen der schweren Ketten) verantwortlich.^[216,222] Er kann in drei Bereiche unterteilt werden: *upper hinge*, *middle hinge*, *lower hinge*. Immunoglobuline der Klasse G haben noch verschiedene Subtypen, die sich eben in den Aminosäuresequenzen ihrer *hinges* unterscheiden. Tabelle 1.3 fasst diese Unterschiede für die Subklassen IgG1 bis IgG4 zusammen. Der Prolin-reiche *middle hinge* enthält dabei die Cysteine in unterschiedlicher Umgebung, die für die intermolekulare Homodimerisierung der schweren Ketten Relevanz besitzen. Die IgG-Subtypen zeichnen sich folglich durch verschiedenste Disulfidmuster aus.^[223] Der *upper hinge* bindet zum C-terminalen Ende des ersten konstanten Bereichs einer schweren Kette (C_{H1}) und damit zum Fab-Bereich, der *lower hinge* dementsprechend zum N-Term des C_{H2} bzw. Fc-Teil. Dabei konnte auch festgestellt werden, dass die Länge des *upper hinges* mit der Segment-Flexibilität des Fab-Teils korrelieren.^[224]

Tabelle 1.3. Aminosäuresequenzen der *hinge*-Region in verschiedenen IgG-Subklassen.^[222,223]

IgG-Typ	<i>upper hinge</i>	<i>middle hinge</i>	<i>lower hinge</i>
1	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
2	ERK	CCVECPPCP	PCPERKAAPPVAGP
3	ELKTPGLDTHHT	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP) ₃	APELLGGP
4	ESKYGPP	CPSCP	APEFLGGP

Generell spielt die Beschaffenheit und Beweglichkeit der *hinge*-Region eine entscheidende Rolle bei der Komplementaktivierung, also das Initiieren einer Immunantwort. So können humane IgG1-Proteine ohne einen *hinge* keine Effektor-Funktion ausführen.^[225,226] Sie werden vorrangig als Monomere isoliert, was über dies hinaus die Wichtigkeit der *hinge*-Region für eine verlässliche kovalente Dimerisierung der schweren Ketten unterstreicht.^[227] Als funktionelle Einheit für den *hinge*-losen Antikörper beschreiben die Autoren jedoch eine tetramere Struktur aus zwei leichten und zwei schweren Ketten vor, wobei eine Disulfidbrücke zwischen den beiden leichten Ketten besteht. Dies führt dazu, dass die Antikörper eine T-ähnliche Geometrie einnehmen und die Ausrichtung der Fab-Arme eine Antigenbindung blockiert,^[226] denn die Dynamik des Antikörpers, wie sie in Abbildung 1.26 dargestellt ist, geht

damit verloren. Durch diesen Flexibilitätsverlust wird es aber auch einfacher, das *hinge*-lose Protein in hoher Auflösung (mit interpretierbarer Elektronendichte) zu kristallisieren. Abbildung 1.27 zeigt Kristallstrukturen von IgG-Antikörpern mit und ohne *hinge*-Region.

Der *hinge* eines Antikörpers als evolutionär entwickelte Domäne nimmt eine entscheidende Rolle für die Dynamik und Konstitution eines dimeren Immunoglobulins ein und ist dementsprechend essentiell für dessen biologische Funktion und Aktivität. Im Prinzip kann man ihn sich als eine Art Stoßdämpfer vorstellen, der die Beweglichkeit der Fab-Arme ermöglicht und bei Bindung eines Antigens diese allosterische Information für die Komplementaktivierung weiterleitet. Welche tatsächlichen Einflüsse *hinge*-Mutationen (bspw. Sequenz und Sequenzlänge, Anzahl der Cysteine, Konformation) auf den Antikörper haben, ist nicht ohne Weiteres vorhersagbar.

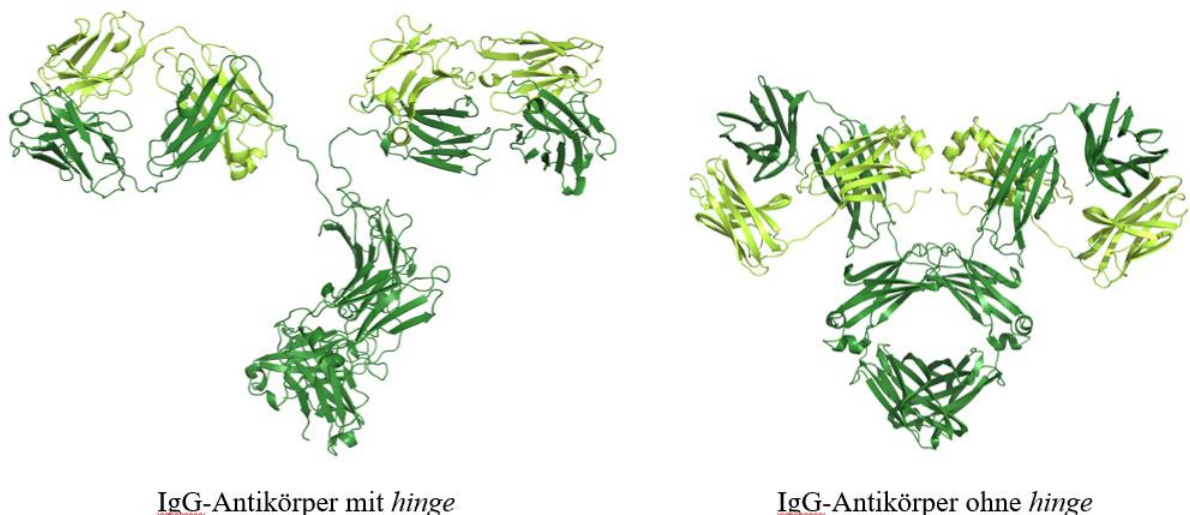


Abbildung 1.27. Kristallstrukturen eines Maus-IgG-Antikörpers mit *hinge*-Region (links, PDB: 1IGT)^[228] und eines Mcg-IgG-Antikörpers ohne *hinge* (rechts, PDB: 1MCO, Mcg: Abkürzung des Namens eines Patienten mit Amyloidose).^[226] Dunkelgrün: schwere Ketten; hellgrün: leichte Ketten.

1.8 Multiple Antigenpeptide

In Kapitel 1.6.2 wurde berichtet, wie Epitop-Dimere (Oligomere) über den Einsatz von Disulfidbrücken synthetisiert werden können. Es gibt aber auch noch andere Template und Methoden, um Mehrfach-Epitope zu erzeugen. Jenseits der Autoimmundiagnostik ist diese Tatsache besonders in Hinblick auf die Entwicklung von Peptid-Vakzinen von Interesse.^[229–231] Prinzipiell ist bekannt, dass auch monomere, synthetische Peptide mit gleicher Sequenz wie das originale Protein die Bildung von spezifischen Antikörpern *in vivo* anregen

können,^[75] jedoch häufig mit schlechten Ergebnissen. In der Natur stellen Pathogene nämlich nicht ein einzelnes, sondern viele verschiedene Epitope in mehrfachen Kopien dar (hier spielt das Prinzip der Avidität, also die Stärke multivalenter Antikörper-Antigen-Bindungen, die zentrale Rolle).^[232,233] Dieses Prinzip wurde von TAM *et al.* eingebunden und sie entwickelten sogenannte *multiple antigenic peptides* (MAP, multiple Antigenpeptide).^[234] Dabei wird das Epitop in vielfacher Kopie auf einem Konjugat präsentiert, wofür verzweigte Lysine verwendet wurden, die bei höheren Konjugaten eine Dendrimer-ähnliche Struktur einnehmen (siehe Abbildung 1.28). So erreicht man schnell hohe, proteinähnliche Molekülmassen. Die Konjugate sind in der Lage, signifikant stärkere humorale Immunantworten zu erzeugen als die monomeren, unkonjugierten Peptide. Der zugrundeliegende Mechanismus für die auftretende stärkere B-Zellen-Aktivierung konnte erst vor kurzem aufgeklärt werden.^[235]

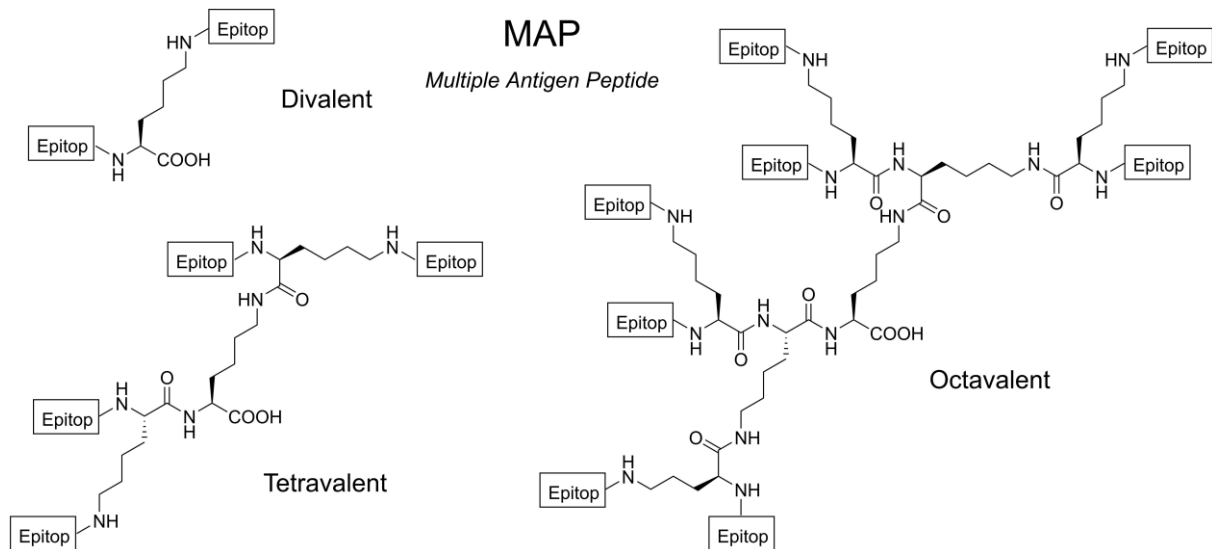


Abbildung 1.28. LEWIS-Darstellung des Lysin-Kerns der *multiple antigen peptides* (MAPs) bis zu octavalenten Konjugaten (beliebig weiterführbar).^[236]

Auf Grundlage der MAPs wurden viele weitere Studien durchgeführt und ihre Anwendbarkeit erweitert. So ist die Einführung von verschiedenen Epitopen auf einem gemeinsamen Gerüst noch wünschenswerter als viele Kopien eines einzelnen Epitops. Derartige heterogene Vakzine entsprächen noch viel mehr der Antigen-Diversität eines Pathogens oder könnten sogar verschiedene Stadien eines Pathogens abbilden.^[231] Gleichzeitig wird der genetischen Variabilität des Immunsystems Rechnung getragen. Dementsprechend wurden zunächst einfach physikalische Gemische heterogener Peptide verwendet; eines, das sich gegen humane Papillomaviren richtet, hat sogar fortgeschrittene klinische Studien erreicht.^[237] Jedoch kann bei derartigen Gemischen nicht sichergestellt werden, dass die Peptidepitope, T-Zellen-Epitope

und andere enthaltene Hilfsstoffe (bspw. Fettsäuren) zu den gleichen Antigen-präsentierenden Zellen transportiert werden und dadurch eine Immunantwort verschlechtert wird oder gar nicht eintritt. Eine Studie von BOERSMA und Mitarbeitern berichtet zu dieser Thematik, dass nur kovalent verknüpfte B- und T-Zell-Epitope (über einen *m*-Maleimid-benzoyl-succinimidester oder 1,6- Bismaleimidhexan, die jeweils zweifach durch N-terminale Cysteine substituiert werden können) Epitop-spezifische Antikörperproduktion induzierte, während Versuche mit einem Gemisch erfolglos blieben.^[238] Zur chemischen Konjugation von Peptidepitopen bzw. MAPs mit anderen Molekülen aller Art, bspw. auch Carriern, steht ein breites Spektrum an Methoden zur Verfügung, bspw. die Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cyclisierung (CuAAC),^[239] die Thioether-Ligation,^[240] die Succinimid-Thioether-Ligation,^[241] die *native chemical ligation* (NCL),^[242] die Hydrazon-Ligation über eine Carbonylfunktion,^[243] oder die Oxim-Ligation.^[244] Um verschiedene Peptidepitope auf einem Poly-Lysin-Kern zu präsentieren, können auch Lysinderivate verwendet werden, deren α - und ϵ -Aminofunktionen unterschiedlich geschützt vorliegen.^[245]

Auf dem Gebiet der multiplen Peptidantigene besteht also eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten, um diese homogen oder heterogen zu synthetisieren und mit verschiedensten anderen Peptiden, Hilfsstoffen oder Carriern zu konjugieren. Sie sind durch ihre Größe und Variabilität vielversprechende Moleküle für die serologische Diagnostik, im Speziellen aber als Vakzine.

1.9 Scanmethoden für Peptide

Scanmethoden, bei denen jede einzelne Aminosäureposition einer Peptidsequenz systematisch durch eine natürliche oder auch nicht-proteinogene Aminosäure ausgetauscht wird (vgl. Abbildung 1.29), spielen eine wichtige Rolle für das Verständnis von Struktur und Funktion des Biomoleküls.^[246] Dabei können Schlüsselpositionen für die biologische Aktivität und/oder Konformation zielgerichtet erfasst werden. Im Laufe eines solchen eindimensionalen Mutationsprozesses entsteht dementsprechend eine Bibliothek an Peptidanaloga. Die wohl bekannteste Methode stellt dabei der Alaninscan dar.^[247–250] Die Logik hinter der Mutation einer Aminosäure zu Alanin besteht darin, dass die Seitenkette bis auf den β -Kohlenstoff verkürzt wird, ohne jedoch die Flexibilität eines Glycins zu besitzen. So kann der Beitrag einer Aminosäureseitenkette zur Rezeptorbindung bestimmt werden. Weitere derartige Positionsscans wurden mit D-Aminosäuren,^[251] Prolin,^[252] β -Aminosäuren,^[253] FREIDINGER-VEBER-Lactamen,^[254] oder konformationell eingeschränkten Pyridon-Dieptiden^[255]

durchgeführt. Anstelle des systematischen 'Durchschiebens' einer bestimmten Mutation kann ein Positionsscan auch so durchgeführt werden, dass eine einzelne Sequenzposition, die sich als essentiell für das Peptid herausgestellt hat (z. B. durch Anwendung der vorgenannten Scans), durch verschiedene andere Aminosäuren ausgetauscht wird (Abbildung 1.29, links).^[256,257]

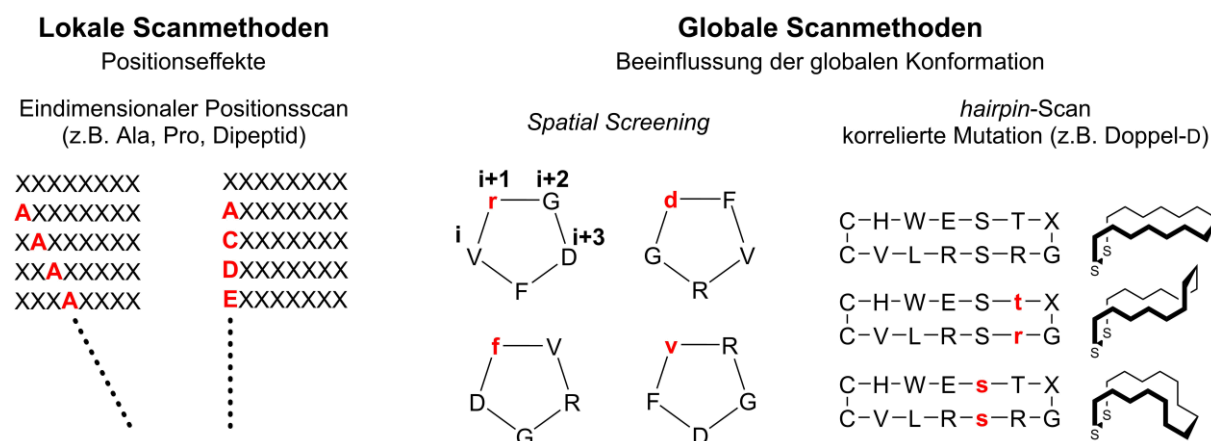


Abbildung 1.29. Gegenüberstellung von lokalen, eindimensionalen und globalen, mehrdimensionalen Scanmethoden.

Von besonderer Interesse für die vorliegende Arbeit sind systematische Mutationen, die nicht nur eindimensionale Positionseffekte hervorrufen, sondern einen mehrdimensionalen, globalen Effekt auf die Konformation bewirken (siehe Abbildung 1.29, rechts). KESSLER und Mitarbeiter verwendeten gezielt D-Aminosäuren, um die jeweilige Sequenzposition in $i+1$ -Position von *turns* in Penta- und Hexapeptiden zu 'zwingen'.^[258–260] Sie nennen diese Vorgehensweise *spatial screening*. In Kapitel 3.5 wird beschrieben, wie die Konformation des antiparallelen β -sheets mit seinen direkt gegenüberliegenden Aminosäurepositionen (siehe auch Abschnitt 1.2) ausgenutzt wird, um Mutationen, die alleine die Konformation stören würden, durch eine zweite korrelierte Mutation zu kompensieren. Systematisch auf die gesamte Struktur angewandt handelt es sich dabei also um einen Doppel-D-Scan (vgl. Abbildung 1.29, rechts und Abbildung 3.25 im Diskussionsteil).

1.10 Strukturaufklärung von Peptiden mittels NMR-Spektroskopie

Nur die exakte Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Molekülen führt letztendlich zum Verständnis ihrer Funktionen und Eigenschaften.^[261,262] Die NMR-Spektroskopie stellt eine wertvolle Methode für die Untersuchung konformationeller Parameter dar, da sie

atomaufgelöste analytische Daten für die konformationellen Peptidepitope und deren Dynamik in Lösung liefert (Nobelpreis 2002 für KURT WÜTHRICH „für seine Entwicklung der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von biologischen Makromolekülen in Lösung“).^[263] Nicht nur die Konstitution und Konformation der Biomoleküle können untersucht werden, sondern auch Gleichgewichtsprozesse und Wechselwirkungen mit anderen Spezies.

Um Peptid- oder Protein-NMR-Spektren von gefalteten Peptiden verstehen zu können, muss man sich der Tatsache bewusst sein, dass sie weitaus komplexer als die Summe der NMR-Signale aller enthaltenen Aminosäuren sind.^[263–265] Die Faltung sorgt für eine vollständig andere chemische Umgebung aller Protonen, da diese nicht wie beim *random coil* im zeitlichen Mittel lösungsmittlexponiert vorliegen, sondern in einem hydrophoben Kern eingeschlossen sind (siehe Abbildung 1.30). Dementsprechend ergeben sich auch andere chemische Verschiebungen, sodass gefaltete und ungefaltete Strukturen mit einem Blick auf ein ¹H-NMR-Spektrum voneinander unterschieden werden können. Aus Abbildung 1.30 wird auch deutlich, dass eine vollständige konformationelle Charakterisierung der Peptide überhaupt erst mit einer hohen Signaldispersion im ¹H-NMR möglich ist. So können die zweidimensionalen Spektren im Detail ausgewertet und räumliche Kontakte (in NOESY-Spektren) eindeutig zugeordnet werden (ein konkretes Beispiel für eine solche Auswertung wird in Kapitel 3.3 beschrieben und ist außerdem immer wieder Teil der gesamten Arbeit).

Die NMR-Spektroskopie liefert also wichtige strukturelle, atomaufgelöste Informationen über Biomoleküle in Lösung und hat in dieser Hinsicht eine besondere Bedeutung inne. Ziel ist es nämlich, *in vitro* solche Messbedingungen zu erreichen, die denen *in vivo* gleichen, also physiologische Parameter in wässriger Umgebung wie dem Blut, Magensaft oder dem Speichel. Im NMR-Röhrchen lassen sich genau diese natürlichen Lösungs-Bedingungen nachstellen, Temperatur, pH-Wert sowie Salzkonzentrationen und -zusammensetzungen in wässrigen Puffermedien gut simulieren.^[263] Dementsprechend müssen NMR-Experimente in wässrigen Puffersystemen durchgeführt werden, um nicht-natürliche Peptid-Solvens-Wechselwirkungen auszuschließen. Letztere können die Sekundär- und Tertiärstruktur des Biomoleküls deutlich verändern oder diese sogar denaturieren.^[266] Eine Messung in reinem D₂O würde jedoch dazu führen, dass die Signale der relativ aciden Amidprotonen durch chemischen Austausch mit dem Lösungsmittel in ¹H-NMR-Spektren nicht mehr sichtbar sind. Dadurch gehen wertvolle Informationen sowohl über chemische Verschiebungswerte als auch Temperaturgradienten und damit über Sekundärstrukturelemente sowie Hinweise auf Wasserstoffbrücken verloren.^[267,268] Gleichzeitig sind die Amidsignale unentbehrlich für eine vollständige Signalmessung.

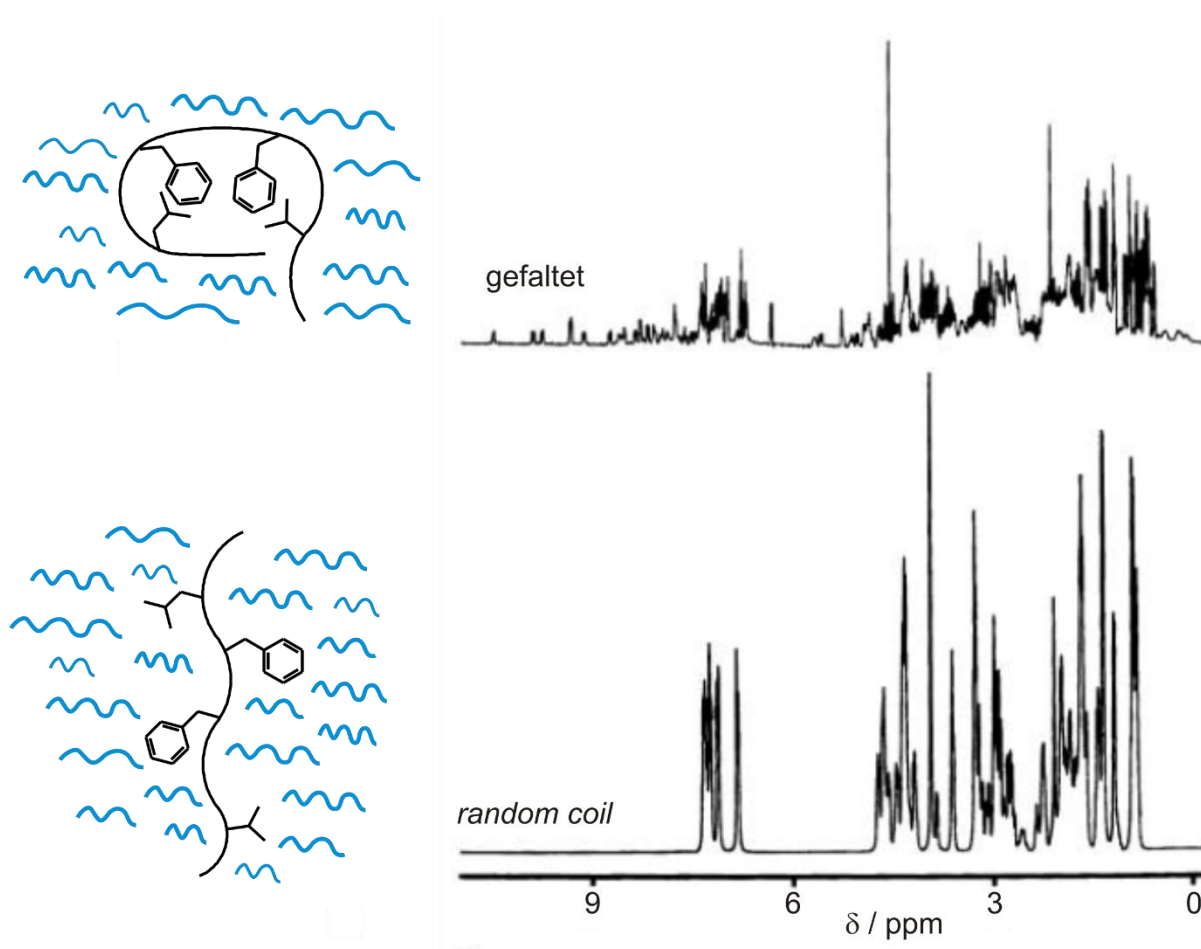


Abbildung 1.30. Oben ist das ^1H -NMR-Spektrum des gefalteten BPTI (*bovine pancreas trypsin inhibitor*) in Wasser abgebildet, unten ein simuliertes Spektrum der ungefalteten Form.^[263] Bei ersterer liegen die Aminosäuren in einem hydrophoben, inneren Kern vor und zeigen daher deutlich andere Verschiebungen als es für die Lösungsmittel-exponierten Protonen der *rc*-Form der Fall ist. Daraus resultiert eine hohe Dispersion aller Signale, die (besonders im amidischen Bereich) unerlässlich für eine vollständige Zuordnung der Sequenz und eine detaillierte Konformationsbestimmung ist.

Möchte man das Peptid in nicht-deutertem Wasser vermessen, so muss das Wassersignal aufgrund der geringen Probenkonzentration möglichst effektiv unterdrückt werden, ohne dabei die Signalintensitäten von Protonensignalen, die eine ähnliche Verschiebung wie Wasser aufweisen, allzu stark zu reduzieren (das betrifft vor allem die $\text{CH}\alpha$ -Peaks). Die **WATERGATE**-Pulssequenz (**WATER** suppression by **GrAdient-Tailored Excitation**) ist die Methode der Wahl, um dies auf effiziente Weise zu erreichen (Abbildung 1.31, oben).^[269,270] Sie ist älteren Methoden wie der Vorsättigung (*Presat*) überlegen (Abbildung 1.31, unten).^[271] Die Pulssequenzen beider Methoden sind vergleichend in Abbildung 1.31 mit Erklärung einzusehen.

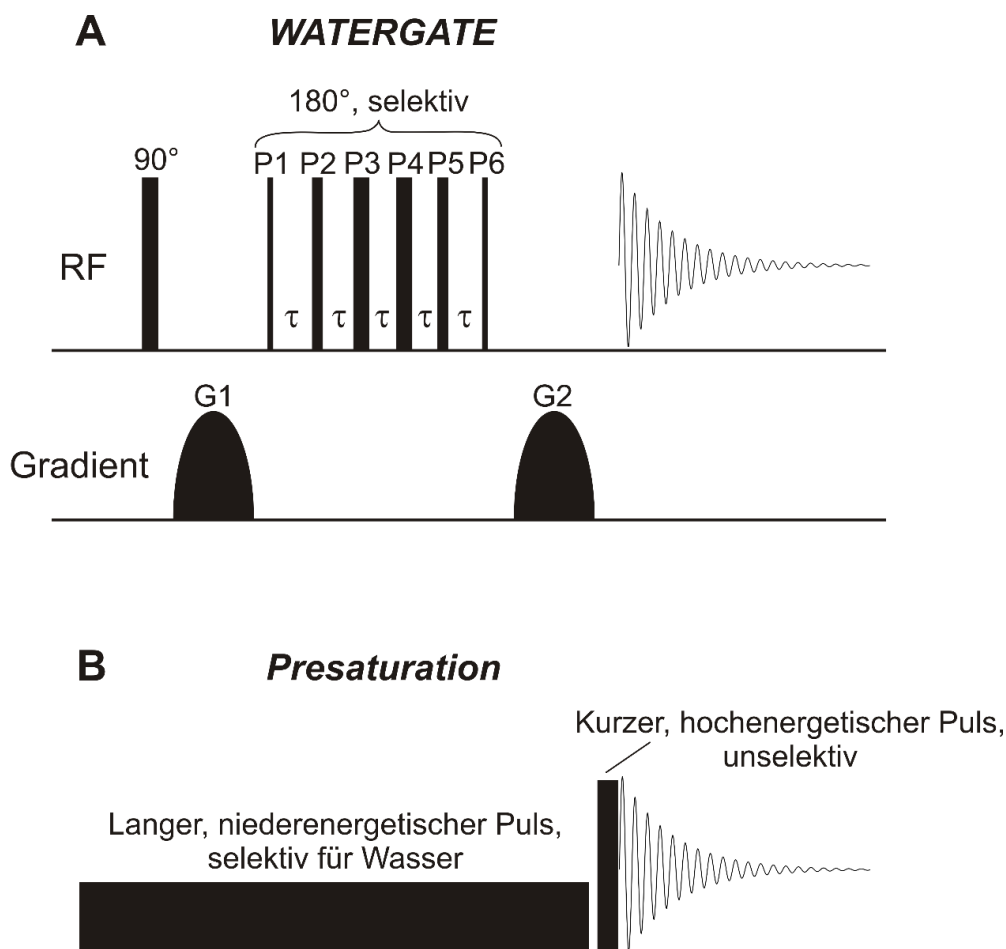


Abbildung 1.31. A: Die *WATERGATE*-Methodik beruht auf dem Prinzip des Gradienten-Spin-Echo.^[269] Die Transmitter-Frequenz ist dabei auf die Wasserresonanz eingestellt. Zunächst wird ein unselektiver, harter 90°-Puls eingestrahlt, dann folgt ein 1-2 ms langer Gradientenpuls (G1), der die *spins* defokussiert. Als nächstes wird ein zusammengesetzter Puls angewendet, der aus sechs harten Pulsen (P1 bis P6) besteht. Er verhält sich wie ein 180°-Puls für alle Signale außer denjenigen der eingestrahlten Resonanz (also Wasser) und alle Signale bei Frequenzen, die n/τ vom Transmitter entfernt liegen (n : ganzzahlig). Ein zweiter Gradientenpuls (G2), der in Größe, Dauer und Vorzeichen G1 entspricht, defokussiert das Wassersignal weiter, während alle anderen *spins* refokussiert werden. Die Gradientenpulse und der zusammengesetzte Puls wirken also auf alle Signale, außer auf das des Wassers, wie ein Spin-Echo. Somit wird der FID unter Unterdrückung der Wasserresonanz durch die beiden defokussierenden Gradientenpulse detektiert. **B:** Bei der einfacheren *Presaturation*-Methodik wird ein langer (im Sekundenbereich), niederenergetischer (mW) Puls mit der Frequenz des Wassersignals eingestrahlt, sodass die Wasserresonanz gesättigt vorliegt. Ein unselektiver, harter Puls sorgt anschließend dafür, dass sich alle verbleibenden *spins* in der transversalen Ebene anordnen und somit detektiert werden können.

2. Aufgabenstellung

Autoantikörper, die bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA) auftreten, werden über die Eigenschaften ihrer komplementären Antigene definiert. Bisherige Peptide, die als diagnostische (RA-)Antigene fungieren, wurden durch das systematische *screening* von Molekülbibliotheken auf der Grundlage citrullinhaltiger Proteine identifiziert. In der vorliegenden Arbeit sollten die ursprünglich flexiblen, citrullinierten Peptide in einer formstabilen β -*hairpin*-Konformation fixiert und mit chemischen Methoden gezielt variiert werden. Ein β -*hairpin* eignet sich aufgrund seines Aufbaus sehr gut, um gegenüberliegende Paare von Aminosäuren korreliert zu verändern und so, in einem modularen Ansatz, verschiedene Mutationen zu kombinieren (siehe Abbildung 2.1). Im Mittelpunkt stand dabei immer auch die Frage, welche molekularen Details ein Peptid epitop überhaupt ausmachen.

Ob eine Einzelmutation, die isoliert die Konformation destabilisiert, durch eine zweite, auf dem antiparallelen β -*sheet* direkt gegenüberliegende Mutation kompensiert werden kann, sollte am Beispiel der Stereochemie der eingebauten Aminosäuren (L/D) überprüft werden. So sollte außerdem ein stereochemischer Knick (oder auch mehrere) in das *hairpin-backbone* sowohl in Wasserstoffbrücken- als auch nicht-Wasserstoffbrücken-Positionen eingebracht werden. Zusätzlich zum bereits vorhandenen, ersten Disulfid sollte ein zweites Disulfid das Peptidantigen weiter konformationell einschränken, wobei zeitgleich Disulfide mit unterschiedlichen Konfigurationen (L/D) kombiniert wurden. Die regioselektive Thioloxydation stellte dabei eine große Herausforderung dar. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, ob teiloxidierte Spezies isoliert und dementsprechend Faltungswege charakterisiert werden können.

Durch die Deletion zweier gegenüberliegender Aminosäuren sollte wiederum festgestellt werden, welche Epitopgröße für eine Antikörpererkennung ausreichend ist. Gleichzeitig sollte die zugehörige β -*hairpin*-Periodizität ($4n+2$ oder $4n$ Aminosäuren) und deren Einfluss auf die Sekundärstruktur analysiert werden. Die Übertragbarkeit von biologischer Aktivität des Filaggrins einerseits und einer stabilen Konformation andererseits sollten am Beispiel des Foldon- β -*hairpins* überprüft werden.

Weitere Details der molekularen Beschaffenheit eines Peptid epitops sollten durch Variationen des *turns*, den Einbau von Citrullinhomologen (also die Länge der harnstofftragenden Seitenkette), das lokale und globale Ladungsmuster, korrelierte β -Aminosäuren und posttranslationale Modifikationen (hier Glycosylierung) aufgedeckt werden.

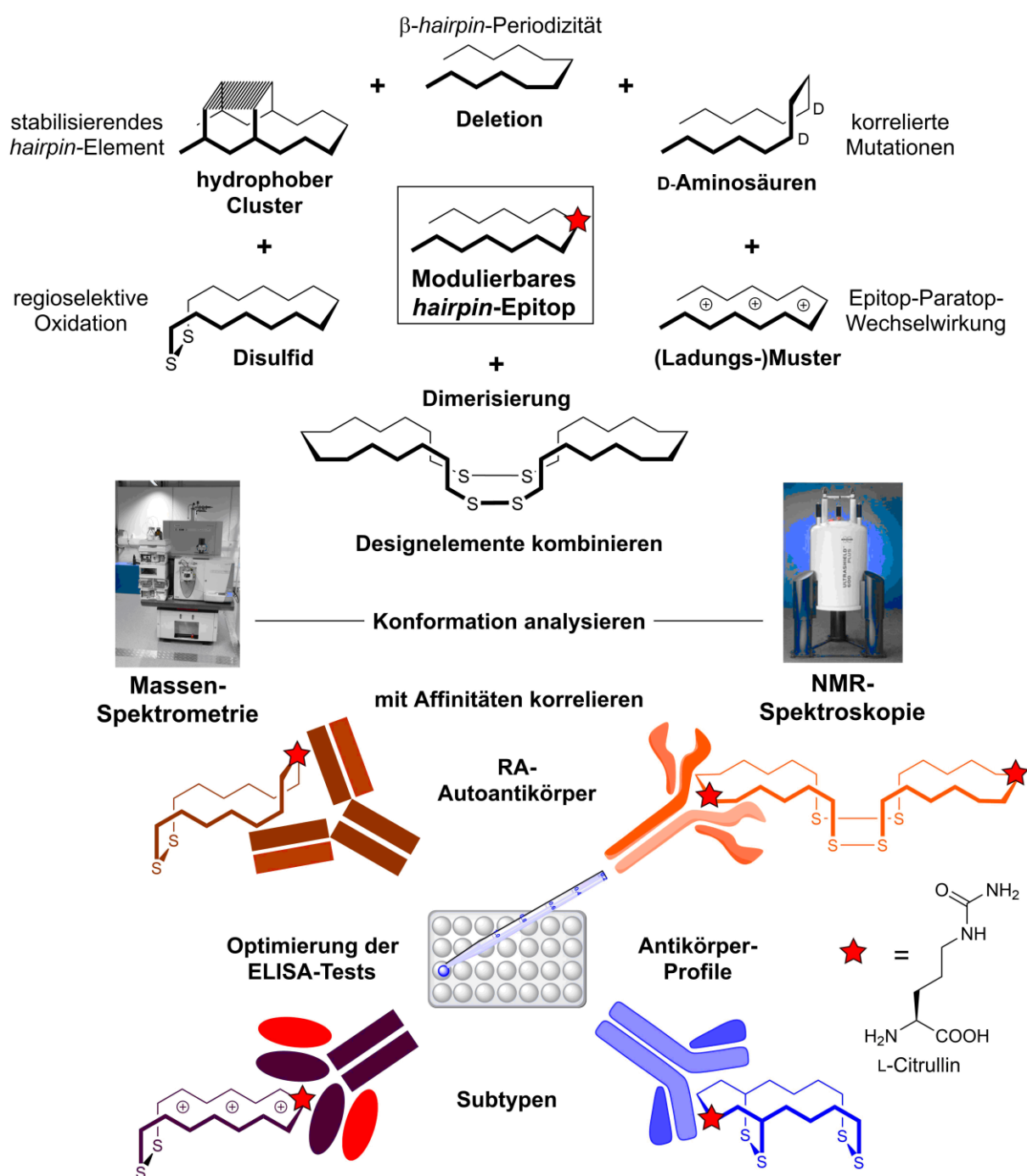


Abbildung 2.1. Formstabile β -*hairpins* (schematisch in der Zickzack-Darstellung) mit festgelegter Konformation sollen synthetisiert werden. Die dabei verwendeten chemischen Methoden (beispielhaft im oberen Teil dargestellt) sind untereinander kombinierbar und werden in gegenüberliegenden Positionen des β -*hairpins* eingeführt. Jedes dieser Designelemente führt zu detaillierten Informationen über die Beschaffenheit der *hairpin*-Epitope. Die über NMR-Spektroskopie bestimmte Konformation wird in ELISA-Tests mit der Affinität gegenüber RA-Autoantikörpern gemessen.

Die aus diesem Ansatz hervorgehenden Formen und deren zugrundeliegende Dynamik wurden mittels moderner NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und CD-Spektroskopie analysiert. Die Formstabilität der Peptide beruht dabei auf der kooperativen Dynamik des Peptidrückgrats und dem kongruenten Ineinandergreifen der Seitenketten. Sie ist durch eine hohe Dispersion im ^1H -NMR-Spektrum, 3J -Kopplungskonstanten und definierte NOE-Kontakte charakterisiert. Die Konformationen sollten mit der Affinität gegenüber RA-Autoantikörpern in ELISA-Tests korreliert werden, wobei deren Methodik optimiert und die Validität, Reproduzierbarkeit sowie Verlässlichkeit überprüft werden sollten. Die zentrale Hypothese war dabei, dass Autoantikörperaffinitäten besser über komplementäre Konformationen, also die passende Kombination aus θ - und ψ -Winkeln aller enthaltenen Aminosäuren, identifiziert und definiert werden können als über die reine Primärstruktur und deren *screening*. Mit einem Set aus konformationell homogenen Peptidantigenen sollte in diesem Zusammenhang überprüft werden, ob kommerziell erhältliche, humane RA-Autoantikörper unterschieden werden können.

Das langfristige Ziel stellt die Unterscheidung von Autoantikörperprofilen von RA-Patienten dar. Dafür sollen in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Universitätsklinikums Gießen und des Rheumazentrums Bad Endbach Patientenblutseren getestet werden. Damit einhergehend soll ein Beitrag zur Erhöhung der diagnostischen Sensitivität geleistet werden, da über die bisher besten diagnostischen Marker (anti-CCP-Antikörper), aber auch andere Testsysteme, nur bis zu 70% aller tatsächlichen RA-Patienten erkannt werden. In diesem Kontext stellt sich die grundlegende Frage, ob keine weiteren, (konformationell) komplementären Autoantikörper auftreten oder ob mit der falschen Systematik nach diesen gesucht wurde.

Darüber hinaus ergab sich die Fragestellung, ob ein auf Formstabilität optimiertes *hairpin*-Peptid als *de novo*-Domäne in einem Protein verwendet werden kann. Mittels rekombinanter Methoden, ausgeführt von Kooperationspartnern, sollte eine Sequenz aus nur zwölf Aminosäuren, die verlässlich dimerisiert, in Enzyme oder Antikörper eingebracht und deren Eigenschaften untersucht werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Wann ist ein Peptid ein Epitop? Die rheumatoide Arthritis und citrullinierte Peptidepitope als Modellsystem

Die Frage danach, wann und warum ein Peptid in einer bestimmten Konformation als Epitop erkannt wird, ist eine zentrale Herausforderung der Immunologie und ein wichtiger Leitfaden für die vorliegende Arbeit.^[1] Chemikern stehen Synthese- und Analytikmethoden zur Verfügung, um die molekularen Grundlagen des Erkennungsprozesses von Selbst und Fremd zu erforschen und zu beeinflussen. Die rheumatoide Arthritis (RA) als Autoimmunerkrankung bietet dabei durch die Vielzahl an verschiedenen Autoantikörpersubtypen, die gegen citrullinhaltige Peptide/Proteine und deren spezifische dreidimensionale Strukturen ausgebildet werden, ein gutes Modell, anhand dessen die oben gestellte Frage erörtert und Lösungen gefunden werden sollen.

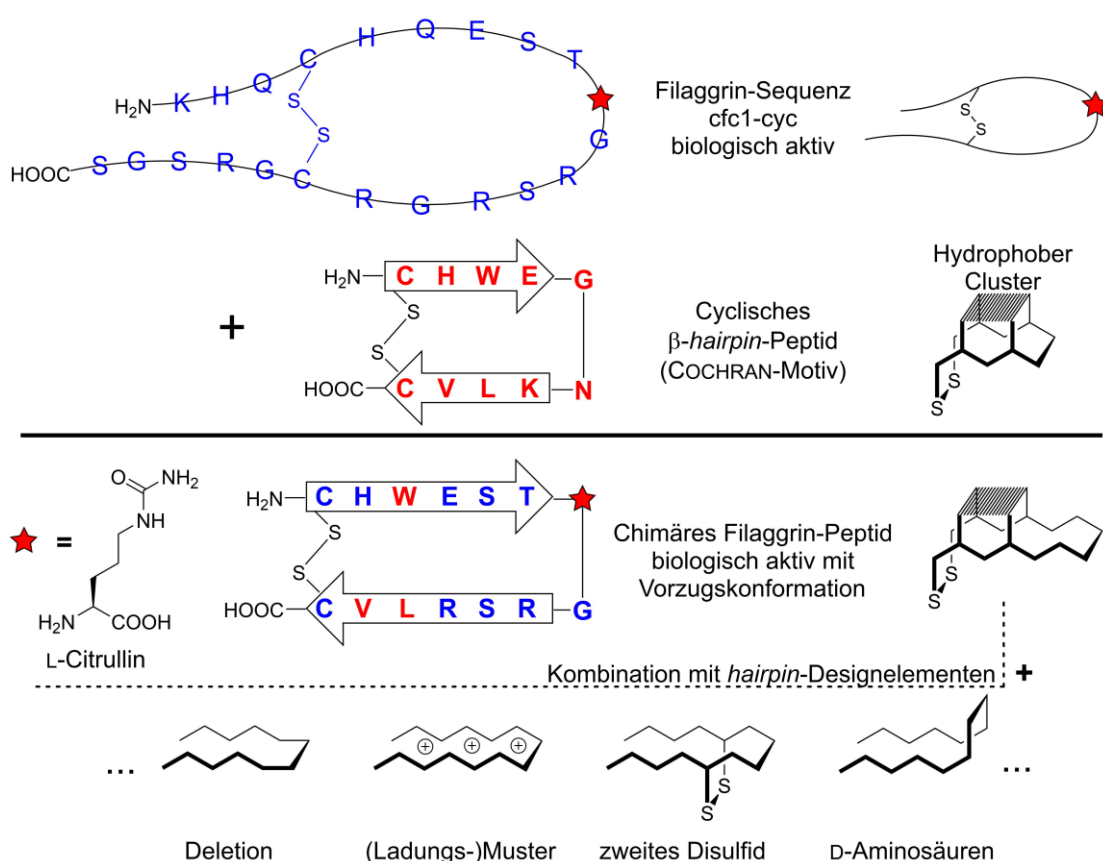


Abbildung 3.1. Kombination der biologisch aktiven, citrullinierten Filaggrin-Sequenz und dem von COCHRAN *et al.* beschriebenen hydrophoben Cluster zur Präsentation von β-turns.^[272] Das dabei entstehende chimäre Filaggrin-Peptid wird mit verschiedenen hairpin-Designmodulen (Modulen) kombiniert, um neue konformationelle Epitope zu erhalten.

Die verwendeten Epitopsequenzen leiten sich vom strukturbildenden Protein Filaggrin ab, das in seiner citrullinierten Form zur Diagnose von RA verwendet wird.^[92] Die biologisch aktive Sequenz umfasst dabei die Aminosäuren 306-324 (L-Citrullin in Position 312, Abbildung 3.1). Diese Sequenz wurde von VAN VENROOIJ *et al.* sowohl als lineare (cfc1) als auch als cyclische Variante (**cfc1-cyc**) synthetisiert und erstmals deren hohes Potential als diagnostischer Marker erkannt.^[84,92] Im Vergleich zur linearen Variante resultierte die Zyklisierung des Peptids (via Disulfid) in einer höheren Autoantikörperaffinität, was zur Entdeckung der anti-CCP-Antikörper (CCP: engl. *cyclic citrullinated peptide*, dt. cyclisches citrulliniertes Peptid) führte, die derzeit am meisten verwendeten diagnostischen Marker für RA. Basierend darauf wurde von GEYER *et al.* die Arbeitshypothese abgeleitet, dass eine weitere Einschränkung der Freiheitsgrade und eine Fixierung des Epitops als β -*hairpin* zu einer hohen Bindungsaffinität führt bei gleichzeitig ermöglichter Aktivitäts-Konformations-Analyse.^[272] Die Arbeitsgruppe präsentierte das citrullinierte Epitop dabei auf einem von COCHRAN *et. al.* entwickelten hydrophoben Cluster^[27,273] in der entsprechenden Sekundärstruktur (Abbildung 3.1). Der Cluster entsteht zwischen Seitenketten von CHWE/RLVC mit polaren Kopfgruppen, die kooperative Salzbrücken ausbilden und durch ein terminales Disulfid abgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden auf Grundlage dieses Filaggrin-abgeleiteten β -*hairpin*-Epitops neue Konformationen gestaltet, indem chemisch-synthetische Modifikationen als modulare Designelemente^[274] kombiniert wurden. Dabei wird die Beschaffenheit von β -*hairpin*-Peptiden ausgenutzt, die abwechselnd H-Brücken- und nicht-H-Brücken-Positionen mit direkt gegenüberliegenden Aminosäurepaaren aufweisen und somit korrelierte Mutationen erlauben. Die Optimierung erfolgt in Bezug auf die Formstabilität der Epitope und liefert durch die Vereinfachung des Bindungsmodus in Richtung Schlüssel-Schloss-Prinzip Hinweise auf die Antikörper-gebundene Konformation. Durch eine Vielfalt an Konformationen werden Informationen über die Beschaffenheit des Epitops, darin enthaltende essentielle Aminosäuren und deren räumliche Orientierung erhalten.

3.2 Synthese der Peptidepitope

Die Filaggrin-abgeleiteten Peptidepitope wurden mittels mikrowellenbeschleunigter, automatisierter Festphasensynthese unter Verwendung von 2CTC-Polystyrolharz (2CTC: 2-Chlortritylchlorid) nach Fmoc-Schutzgruppenstrategie synthetisiert (Abbildung 3.2; alle weiteren Details dazu finden sich im experimentellen Teil). Die Peptide, die Cysteine enthalten, wurden durch Luftoxidation in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer ($c_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mg/mL}$, pH 8.4) zu Disulfiden

oxidiert. Im Falle einer nicht ablaufenden oder sehr langsamen Oxidation wurde H_2O_2 (30% in H_2O , 100 μL / 100 mL H_2O) zugegeben. Bei Vorhandensein von mehr als einem Disulfid im Peptid wurde generell auf orthogonale Cystein-Schutzgruppenstrategien verzichtet, um die korrekte Disulfidpaarung durch konformationelle Präorganisation des Peptids in Lösung zu erreichen.

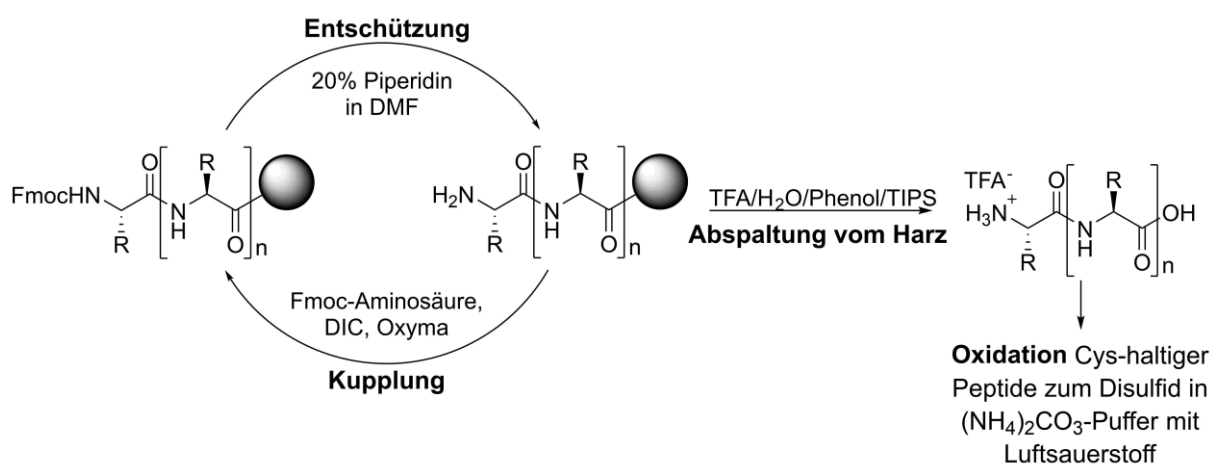


Abbildung 3.2. Schematische Übersicht über die Festphasensynthese von Peptidepitopen nach Fmoc-Schutzgruppenstrategie mit anschließender Luftoxidation von Cys-haltigen Sequenzen.

3.3 Formstabilität - Methodik der Strukturaufklärung

Auf der Grundlage der in Abbildung 3.1 beschriebenen Kombination der biologisch aktiven Filaggrin-Sequenz und des COCHRAN-Clusters wurde die 15er-Aminosäuresequenz **1** synthetisiert (das N-terminale Lysin wurde für die Verwendung in ELISA-Tests addiert, siehe Kapitel 3.4). Diese Sequenz diente in allen weiteren Experimenten als Referenzpeptid sowohl in Bezug auf die Konformation eines all-L-*hairpins* als auch auf dessen hohe Antikörperaffinität. Abbildung 3.3 enthält die Sequenz und eine daraus abgeleitete schematische Zickzack-Darstellung des all-L-*hairpins* mit hydrophobem Cluster und Disulfidbrücke. Die Piktogramme dienen als vereinfachte Darstellung eines β -*hairpins* in der gesamten vorliegenden Arbeit. Sie verdeutlichen in schematischer Art und Weise Änderungen, die am *backbone* vorgenommen werden. In diesem Abschnitt wird einerseits die Vorgehensweise für das Auswerten eines solchen β -*hairpin*-Peptids beispielhaft erklärt, andererseits die grundlegenden konformationellen Eigenschaften als Basis für einen zukünftigen Vergleich mit abgeleiteten Spezies im Detail analysiert und erläutert. Im Zusammenhang mit den NMR-Daten der Peptide wird auch klar, was sich hinter dem Begriff der Formstabilität verbirgt: eine hohe Dispersion der ^1H -NMR-Signale sowie definierte 3J -

Kopplungskonstanten und NOE-Kontakte, die eine exakte Bestimmung der Sekundärstruktur (*backbone*) und Zuordnung der eng verzahnten Seitenketten und ihrer Rotamere (also mindestens χ_1 -Winkel) ermöglichen.

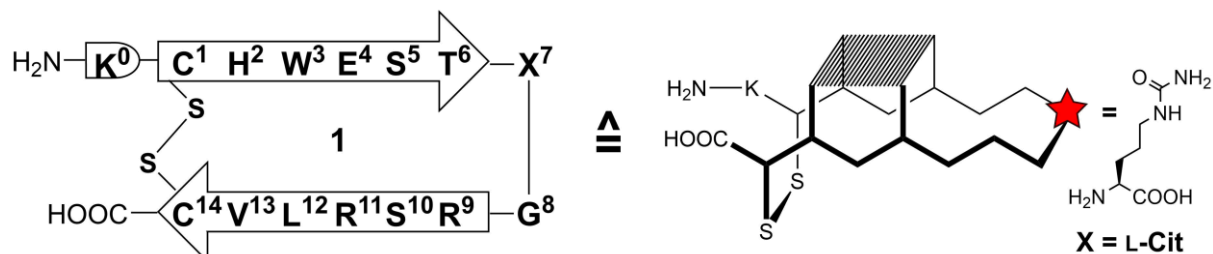


Abbildung 3.3. Sequenz und Nummerierung des Referenzpeptids **1** (links) sowie in eine schematische Zickzackdarstellung übersetzt (rechts). Diese Art von Piktogramm wird im Folgenden durchgängig verwendet, um Änderungen des *backbones* schematisch zu verdeutlichen.

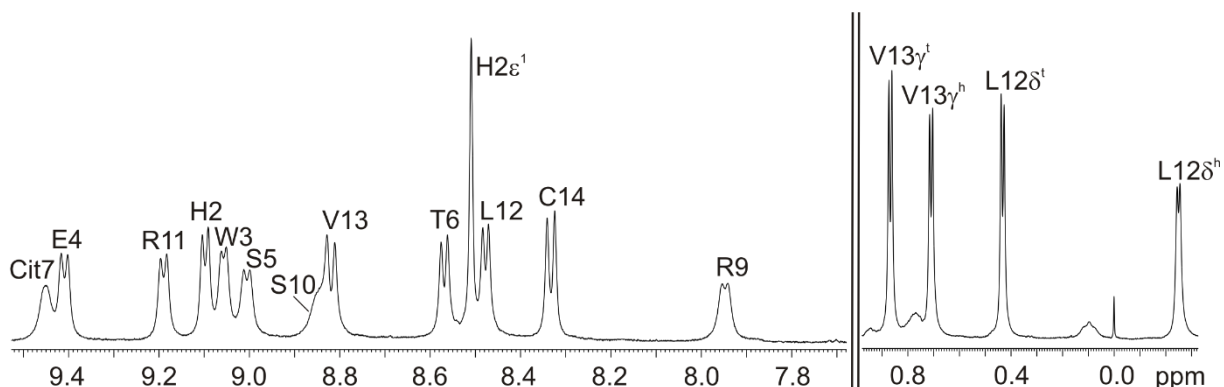


Abbildung 3.4. Ausschnitte aus dem ^1H -NMR von Peptid **1** (600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1). Die hohe Signaldispersion im amidischen Bereich ist charakteristisch für ein Peptid mit Vorzugskonformation in wässriger Lösung. Die Hochfeldverschiebung der L¹²-H δ -Signale ist typisch für den intakten COCHRAN-Cluster (h : Hochfeld, t : Tieffeld).

Das Auswerten eines Peptids auf Grundlage moderner NMR-spektroskopischer Techniken beginnt mit dem ^1H -NMR-Spektrum. Beim Vorliegen einer beweglichen *random coil*-Struktur erhält man zeitgemittelte Daten mit geringer Signaldispersion. Liegt jedoch eine Vorzugskonformation in Lösung vor, so ist die chemische Umgebung der verschiedenen Protonen-Signale im zeitlichen Mittel unterschiedlich, was zu einer entsprechend hohen Signaldispersion führt (siehe auch Einleitung 1.9). Folglich ermöglicht erst die Formstabilität der Peptide in Lösung eine detaillierte Auswertung mittels NMR-Spektroskopie, sodass die Bestimmung von Temperaturgradienten, also die temperaturabhängige Änderung der chemischen Verschiebung, 3J -Kopplungen und definierten NOE-Kontakten durchführbar wird.

In den vorliegenden Peptiden ist zum einen der amidische Protonenbereich im ^1H -NMR-Spektrum von Bedeutung, zum anderen die Hochfeldverschiebung der L12-H δ -Protonen, die durch den Ringstromeffekt des gegenüberliegenden W3-Indols (aliphatisch-aromatische Wechselwirkung) zustande kommt. Je stabiler die Faltung, desto näher kommen sich die beiden Seitenketten, was eine stärkere Hochfeldverschiebung zur Folge hat. In Abbildung 3.4 sind die entsprechenden Ausschnitte aus dem ^1H -NMR von Peptid **1** dargestellt (eine Abbildung des gesamten Spektrums ist im Experimentellen Teil einzusehen). Neben der hohen Signaldispersion sind für das hier beschriebene β -hairpin-Peptid **1** einige Charakteristika feststellbar: eine typische Hochfeldverschiebung des R9-NHs in $i+1$ -Position des *turns* sowie eine starke Tieffeldverschiebung des Cit7- sowie des E⁴-NHs als auch von R11, H2, W3, S5, S10 und V13. Generell wird eine Tieffeldverschiebung der NH-Signale (im Vergleich zu *random coil*-Werten) mit dem Vorliegen einer β -sheet-Struktur verbunden,^[268,275] was die vorliegenden Daten eindeutig widerspiegeln. Das C1-NH ist durch die Nähe zur Ammoniumseitenkette des K0 nicht sichtbar.

Das Amidproton des G8 in $i+2$ -Position ist für diese Spezies nicht sichtbar. Der *turn* steht in einem dynamischen konformationellen Austausch zwischen βI - und βII -Typ, der einen 180° *flip* der zentralen Peptideinheit, die C α_{i+1} und C α_{i+2} verknüpft, bedingt. Es findet eine konzertierte Rotation in entgegengesetzte Richtung um den Ψ_{i+1} -Winkel (C α -CO) und Φ_{i+2} -Winkel (NH-C α) statt, wobei die flankierenden Sequenzabschnitte und die Seitenketten kaum Veränderungen erfahren.^[276] Dieser konformationelle Austausch ist für die Verbreiterung des G⁸-NH-Signals verantwortlich.

Um die peptidischen NMR-Signale vollständig zuordnen zu können, werden 2D-Spektren benötigt. Dazu liefern das TOCSY-Spektrum über die Kopplung der Aminosäure-Spinsysteme sowie das NOESY-Spektrum über räumliche (statt skalare) Kopplungen Informationen sowohl über die Art der enthaltenen Aminosäuren als auch über die Verknüpfung. Letzteres wird durch die Tatsache ermöglicht, dass die amidischen Protonen innerhalb eines β -sheets (in der *turn*-Region des β -hairpins abweichend) jeweils einen schwachen NOE-Kontakt zum H α der eigenen Aminosäure zeigen, während ein intensiver NOE-Kontakt zum H α der vorhergehenden Aminosäure beobachtet wird. Gleichzeitig werden also auch strukturelle Informationen gewonnen. Sind alle Kopplungssignale sichtbar, so kann aufgrund der eben beschriebenen Tatsache ein sogenannter *sequential walk* durchgeführt werden. Abbildung 3.5 zeigt das NOESY-Spektrum von Peptid **1** mit dem *sequential walk*.

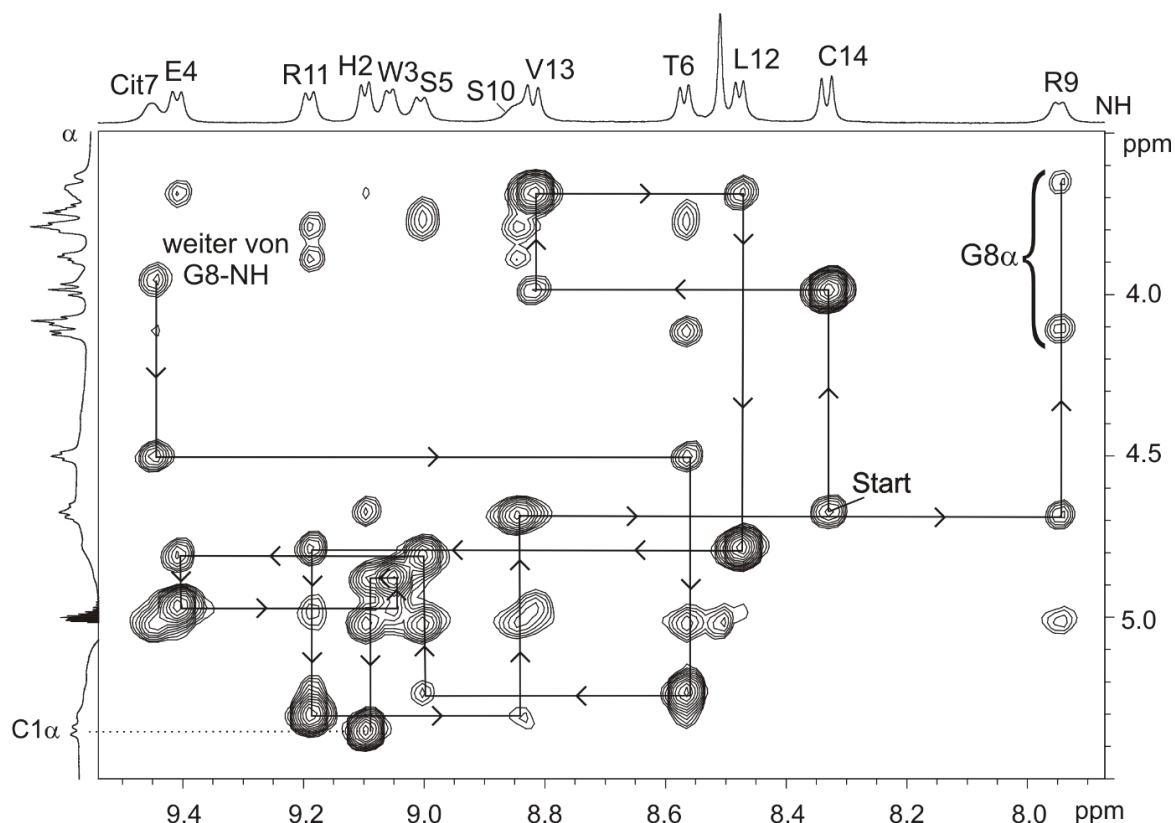


Abbildung 3.5. Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von Referenzpeptid **1** (600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1). In β -sheets zeigen die NHs der Aminosäuren jeweils einen schwachen NOE zum eigenen H α und einen intensiven zum H α des vorhergehenden Bausteins. Dadurch ist es möglich, die Reihenfolge der Aminosäure-Verknüpfung über den hier eingetragenen *sequential walk* zu bestimmen.

Mit den zuvor genannten Techniken ist die richtige Konstitution des Peptids und dessen korrekte Sequenz bewiesen worden. In einer dazu komplementären Vorgehensweise können auch *interstrand*-NOE-Kontakte innerhalb des *hairpins*, also solche zwischen den beiden β -sheet-Strängen, die über den *turn* verknüpft sind, analysiert werden. Dabei ergibt sich im Falle einer solchen Vorzugskonformation eine festgelegte Abfolge von H α -H α -, H α -NH-, NH-NH- und NH-H α -Kontakten. Diese Abfolge ist in Abbildung 3.6 samt der entsprechenden NOE-Kontakte in den zugehörigen Spektren von Peptid **1** dargestellt.

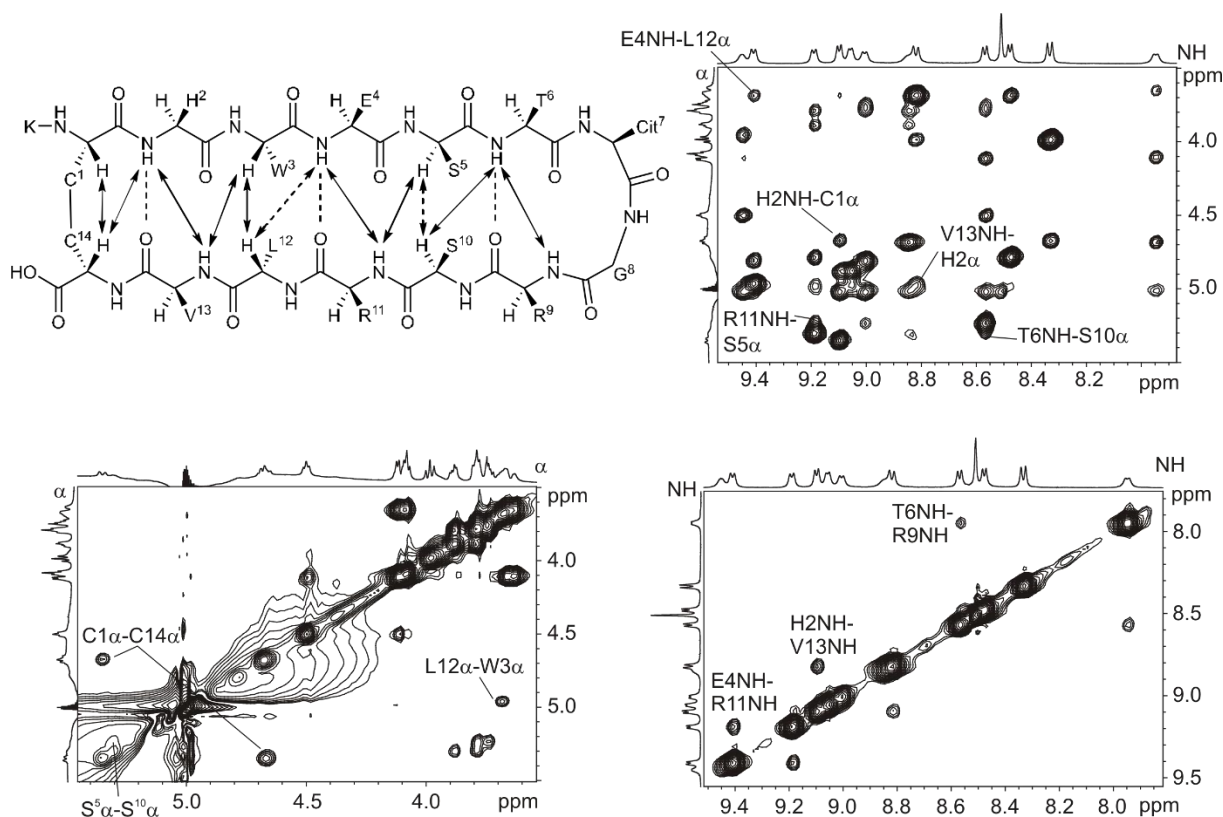


Abbildung 3.6. Innerhalb eines β -hairpins ist eine bestimmte Abfolge von $\text{H}\alpha$ - $\text{H}\alpha$ -, $\text{H}\alpha$ -NH-, NH-NH- und NH- $\text{H}\alpha$ -NOE-Kontakten zu erwarten. Die abgebildeten Spektrenausschnitte (600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1) zeigen die entsprechenden Kontakte, die in schematischer Weise in der LEWIS-Formel oben links eingetragen sind. Gestrichelte Pfeile kennzeichnen nicht eindeutig zuordenbare Kontakte (durch Überlappung von Signalen).

Weitere wichtige strukturelle Parameter sind über die Temperaturgradienten der amidischen Protonen im ^1H -NMR-Spektrum ableitbar. Dabei wird ausgelesen, um wie viele ppb sich ein Signal pro Temperaturänderung um 1 K verschiebt ($\Delta\delta/\Delta T$). Befindet sich der NH-Wasserstoff in einer Wasserstoffbrückenbindung (oder einer anderen Lösungsmittel-unzugänglichen Umgebung), so zeigt er einen geringen ppb/K-Wert, während Signale von Lösungsmittel-exponierten Protonen eine hohe Temperaturabhängigkeit aufweisen.^[277] Dieses Verhalten ist im Besonderen für große Proteine mit globulärer räumlicher Struktur zu beobachten und nur unterhalb der Denaturierungstemperatur linear. Das Verfahren ist generell auch auf Peptide anwendbar, wobei nur formstabile Spezies ohne schnellen konformationellen Austausch wichtige komplementäre Informationen ergeben.^[261] Da sich im β -hairpin die amidischen Protonen abwechselnd in H-Brücken-gebundenen und nicht-H-Brücken-gebundenen Positionen befinden, werden also alternierend niedrige bzw. hohe $\Delta\delta/\Delta T$ -Werte erwartet. Dies hat dementsprechend nur für die Aminosäuren Gültigkeit, die Teil des antiparallelen β -sheets

sind, und nicht für diejenigen im *turn* (hier Cit7 in $i+1$ und G8 in $i+2$). Abbildung 3.7 zeigt die ^1H -NMR-Spektren von Referenzpeptid **1** und die daraus abgelesene Temperaturabhängigkeit der Signale, die die vorhergehenden Ausführungen zu β -hairpins bestätigt.

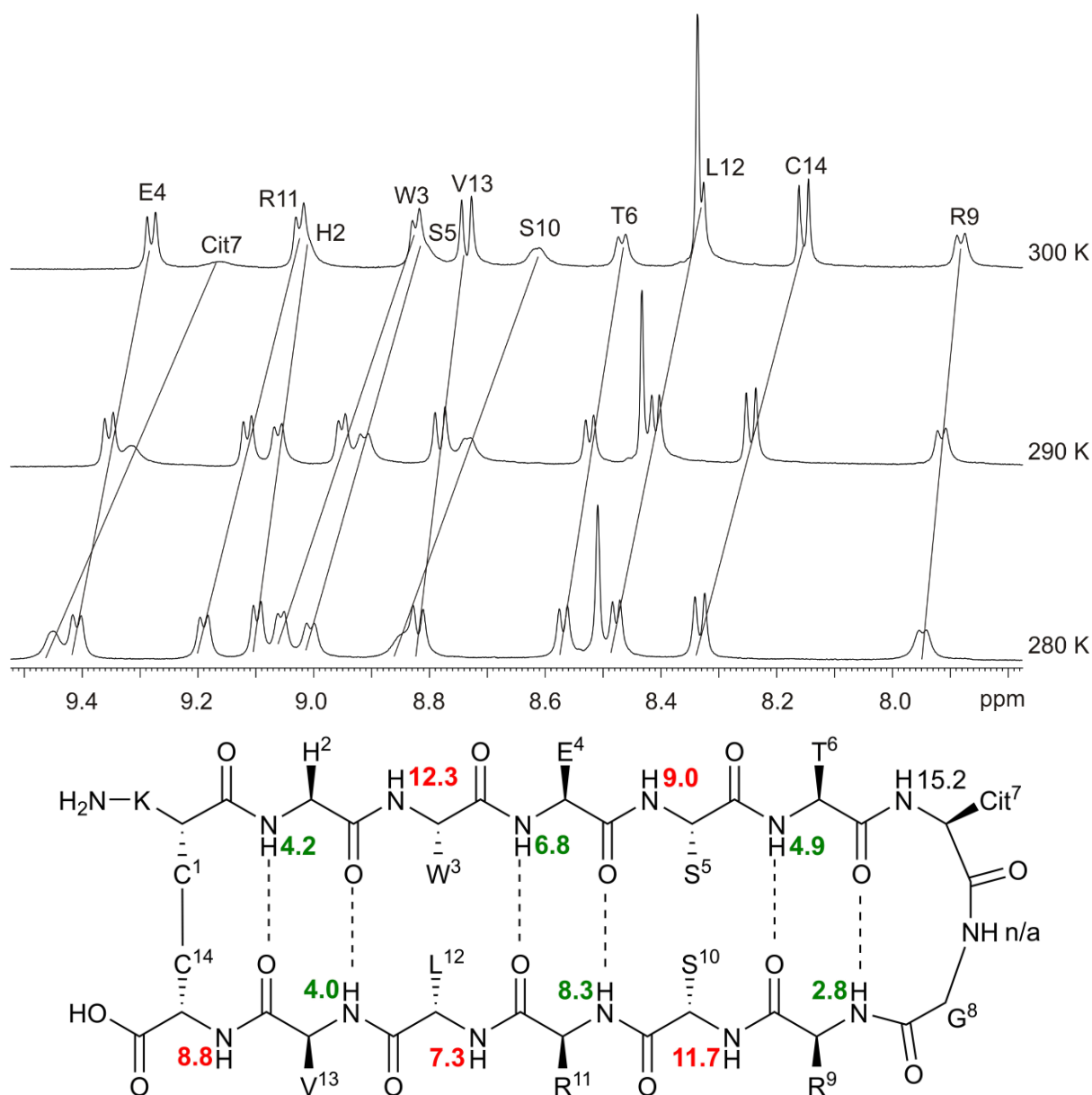


Abbildung 3.7. NH-Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren des Referenzpeptids **1** bei 280, 290 und 300 K (600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1). Die Linien zeigen die temperaturabhängige Verschiebungsänderung der amidischen Protonen an. Darunter ist eine schematische LEWIS-Darstellung des β -hairpins **1** mit den aus den Spektren abgelesenen Temperaturgradienten in ppb/K dargestellt.

3.3.1 Seitenkettenrotamere

Über die bisher genannten Techniken wurden grundlegende Informationen über Konstitution, Sequenz und räumliche Struktur des β -*hairpins* **1** gewonnen. Allein der Vergleich der bisher verwendeten Parameter, also Signaldispersion und -verschiebung, *sequential walk*, *interstrand*-NOE-Kontakte und Temperaturgradienten, geben wichtige lokale und globale Informationen über Konformationsänderungen, die durch Mutationen des Gerüsts auftreten. Darüber hinaus können Seitenkettenrotamere bestimmt und so weitere Details über Vorzugskonformation eines Peptids gewonnen werden. Dafür wird der Diederwinkel χ_1 bestimmt, der zwischen NH-C α -C β -R (R: Seitenkettenrest je nach Aminosäure) aufgespannt wird. Dabei gibt es prinzipiell nur drei energetisch günstige Winkelkombinationen: 60°, -60° und 180° (siehe Abbildung 3.8 für die entsprechenden NEWMAN-Projektionen). Diese repräsentieren gestaffelte Konformere, während ekliptische Konformationen, bei denen die Substituenten auf Deckung stehen, energetisch höher liegende Zustände darstellen. Unter den gestaffelten Konformationen sind wiederum diejenigen am energetisch ungünstigsten, in welcher sich der Seitenkettenrest R zwischen Amino- und Carboxyl-Funktion befindet (60° für L-Aminosäuren, -60° für D-Aminosäure). Sie sind jedoch nicht auszuschließen.

Für das Bestimmen der Seitenkettenrotamere stehen generell zwei Parameter zur Verfügung: 3J -Kopplungskonstanten, sofern sie (trotz der Vielzahl an ^1H -Signalen des Peptids) auslesbar sind, und NOE-Kontakte. Der Diederwinkel steht nach der KARPLUS-Beziehung in direktem Zusammenhang mit den Kopplungskonstanten^[278,279] und beeinflusst außerdem den räumlichen Abstand von Protonen, was wiederum für ein bestimmtes Muster an intensiven und weniger intensiven NOE-Kontakten zwischen CH α und CH β bzw. NH und CH β führt. Tabelle 3.1 stellt in Übereinstimmung mit Abbildung 3.8 übersichtlich zusammen, welche Kombination an Kopplungskonstanten bzw. NOE-Kontakten für welches Rotamer spricht. Die in den NEWMAN-Projektionen mit 1 und 2 beschrifteten β -Protonen sind prochiral, wobei die Zuordnung pro-(*R*) und pro-(*S*) vom Seitenkettenrest R der jeweiligen Aminosäure abhängig ist. Gleichzeitig mit dem Seitenkettenrotamer kann also auch bestimmt werden, welche Prochiralität die β -Protonen besitzen und ob es sich dabei um das hochfeldige oder tieffeldige ^1H -NMR-Signal handelt.

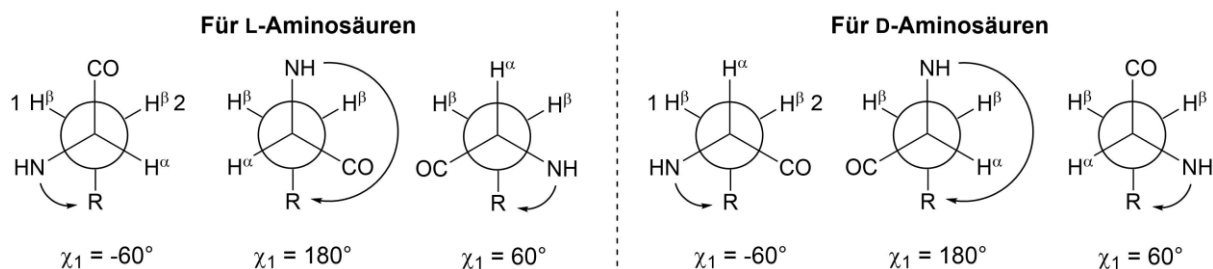


Abbildung 3.8. Energetisch günstigste, gestaffelte Rotamere einer beliebigen L- oder D-Aminosäure (die ekliptischen Konformere werden unter der Annahme eines zu hohen Energiegehalts ausgeschlossen). Die NEWMAN-Projektion verläuft entlang der C α -C β -Atome, der χ_1 -Diederwinkel wird zwischen NH-C α -C β -R (R: Seitenkettenrest je nach Aminosäure) aufgespannt. Die H β -Protonen sind mit 1 und 2 bezeichnet, um sie bei diastereotoper Aufspaltung im ^1H -NMR zu differenzieren (die Zuordnung pro-(R) und pro-(S) ist vom Seitenkettenrest R abhängig).

Tabelle 3.1. Übersicht über die Kombinationen aus skalaren Kopplungskonstanten und NOE-Kreuzsignalen für die Bestimmung von Seitenkettenrotameren und die diastereotopie Zuordnung der β -Protonen in Übereinstimmung mit Abbildung 3.8 (β -Protonen als 1 und 2 zugeordnet, da die Zuordnung pro-(R) und pro-(S) vom Seitenkettenrest R abhängig ist).

Stereokonfiguration	Parameter	$\chi_1 = -60^\circ$	$\chi_1 = 180^\circ$	$\chi_1 = 60^\circ$
L	$^3J(\text{H}\alpha, \text{H}\beta 1)$	10-14 Hz	3-5 Hz	3-5 Hz
	$^3J(\text{H}\alpha, \text{H}\beta 2)$	3-5 Hz	10-14 Hz	3-5 Hz
	NOE (H α , H $\beta 1$)	klein	groß	groß
	NOE (H α , H $\beta 2$)	groß	klein	groß
	NOE (NH, H $\beta 1$)	groß	groß	klein
	NOE (NH, H $\beta 2$)	klein	groß	groß
D	$^3J(\text{H}\alpha, \text{H}\beta 1)$	10-14 Hz	10-14 Hz	3-5 Hz
	$^3J(\text{H}\alpha, \text{H}\beta 2)$	10-14 Hz	3-5 Hz	10-14 Hz
	NOE (H α , H $\beta 1$)	groß	klein	groß
	NOE (H α , H $\beta 2$)	groß	groß	klein
	NOE (NH, H $\beta 1$)	groß	groß	klein
	NOE (NH, H $\beta 2$)	klein	groß	groß

Als erstes wurden für Peptid **1** die Seitenkettenrotamere der Cysteine bestimmt. Die Disulfidbrücken spielen eine wichtige Rolle für die Stabilisierung der β -*hairpin*-Konformation und im Verlauf dieser Arbeit werden Peptide mit mehr als einer Disulfidbrücke diskutiert. Die Kopplungskonstanten der β -Signale von C1 und C14 zeigen in diesem Fall nur die 2J -Kopplung der diastereotopen Protonenpaare an (~ 14 Hz) oder fallen mit anderen Signalen zusammen. Dementsprechend müssen 2D-Spektren zu Rate gezogen werden. Diese finden sich in Abbildung 3.9 wieder. Zu sehen sind ein Ausschnitt des HSQC-Spektrums der β -Protonen sowie NOESY-Spektren, die die Kopplung der β -Protonen mit den α -Protonen bzw. den NHs zeigen. Außerdem sind Spektren angezeigt, die die Kontakte der $H\beta$ s von C1 und C14 mit anderen Aminosäuren aufzeigen.

Die Auswertung der NOE-Kontakte von C1 (das C1-NH-Signal ist nur bei pH = 3.0 vorhanden) ergibt Folgendes (h: Hochfeld, t: Tieffeld):

- $H\beta^h$ zeigt ein intensives NOE-Kreuzsignal zu $H\alpha$ und ein schwaches zum NH
- $H\beta^t$ zeigt ein schwaches NOE-Kreuzsignal zu $H\alpha$ und ein intensives zum NH

Daraus ergibt sich nach Tabelle 3.1 ein χ_1 -Winkel von -60° für C1. Übersetzt man die NEWMAN-Projektion in LEWIS-Schreibweise ergibt sich außerdem, dass $H\beta^h$ dem pro-(*R*)- und $H\beta^t$ dem pro-(*S*)-Proton entspricht.

Die Auswertung der NOE-Kontakte von C14 ergibt Folgendes (h: Hochfeld, t: Tieffeld):

- $H\beta^h$ zeigt ein schwaches NOE-Kreuzsignal zu $H\alpha$ und ein intensives zum NH
- $H\beta^t$ zeigt ein intensives NOE-Kreuzsignal zu $H\alpha$ und ein schwaches zum NH

Auch für C14 ergibt sich damit ein χ_1 -Winkel von -60° . Hier entspricht $H\beta^h$ dem pro-(*S*)-Proton, während $H\beta^t$ das pro-(*R*)-Proton darstellt.

Darüber hinaus können noch NOE-Kontakte zu weiteren, räumlich benachbarten Aminosäuren bestimmt werden. Alles in allem ergibt sich damit ein detailliertes Bild über die Ausrichtung und Umgebung der Aminosäureseitenkette, wie in Abbildung 3.9 (unten) zusammengefasst.

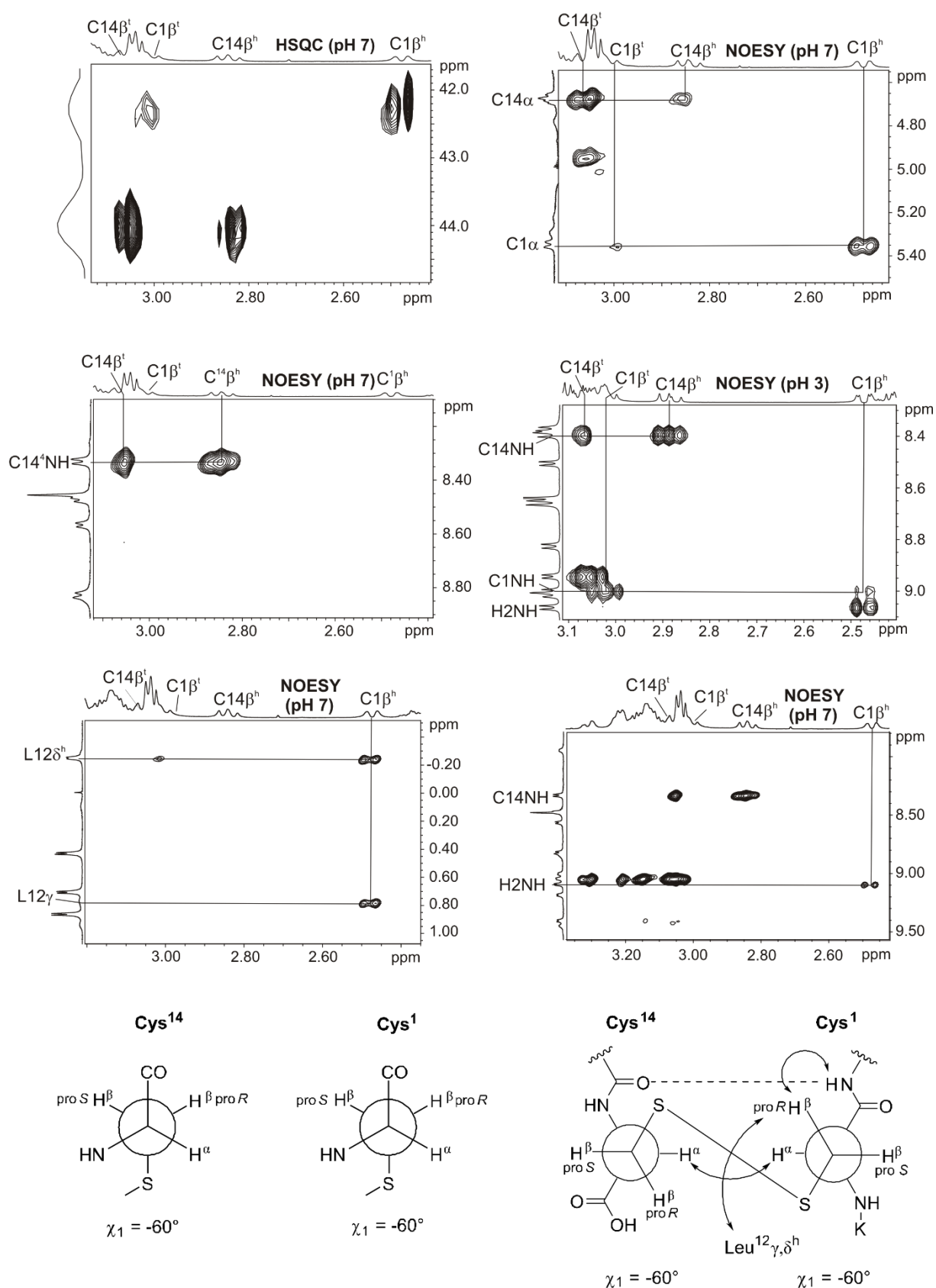


Abbildung 3.9. Ausschnitte aus den für die Seitenkettenrotameren-Bestimmung benötigten NMR-Spektren (600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM)/D₂O 9:1) des Referenzpeptids **1**. Die Ergebnisse sind am unteren Ende in NEWMAN-Projektionen zusammengefasst (^h: Hochfeld, ^t: Tieffeld).

Mit dieser Vorgehensweise können die Seitenkettenrotamere von Aminosäuren bestimmt werden, deren Signale vorhanden/auslesbar sind und deren β -Protonen eine diastereotopie Aufspaltung zeigen. Ebenso können weitere Diederwinkel in längeren Seitenketten bestimmt werden (χ_2 , χ_3 , etc. je nach Anzahl der weiteren Kohlenstoffatome im Gerüst). Tabelle 3.2 fasst diejenigen χ -Winkel, die verfügbar sind, für die jeweiligen Aminosäuren der Sequenz von Peptid **1** zusammen (die zugehörigen Spektren sind im Anhang 8.1 einsehbar). Auffällig sind die energetisch ungünstigeren χ_1 -Winkel von H2 und R11 mit 60° . Dieser lässt sich aufgrund der räumlichen Anordnung des Imidazols von H2 innerhalb des hydrophoben Clusters auf der Oberseite (H2/E4/R11/V13) des *hairpins* erklären. Der Heteroaromat ist zwischen E4 und V13 „eingeklemmt“. [272,280] Ähnliches gilt für die positiv geladene Guanidiniumgruppe des R11, die potentiell in Wechselwirkung mit dem gegenüberliegenden, negativ geladenen E4-Carboxylat treten kann, aber auch Kontakte zum V13 zeigt.

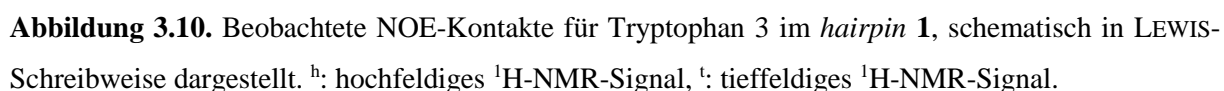
Tabelle 3.2. χ -Winkel und prochirale Zuordnung der zuordenbaren Aminosäuren von Peptid **1**. Alle zugehörigen Spektren sind im Anhang (Kapitel 8.1) mit Kommentar und NEWMAN-Projektionen einzusehen.

Aminosäure	H β^h	H β^t	χ_1	χ_2	χ_3
C1	pro-(<i>R</i>)	pro-(<i>S</i>)	-60°	-	-
H2	pro-(<i>S</i>)	pro-(<i>R</i>)	60°	-	-
W3	pro-(<i>R</i>)	pro-(<i>S</i>)	-60°	-	-
E4	pro-(<i>R</i>)	pro-(<i>S</i>)	-60°	180°	-
R11*	pro-(<i>S</i>)	pro-(<i>R</i>)	60°	180°	n/a
L12	pro-(<i>R</i>)	pro-(<i>S</i>)	180°	180°	-
V13			Me $^\gamma$ pro-(<i>R</i>): 180° (V13-H γ^t)	-	-
			Me $^\gamma$ pro-(<i>S</i>): -60° (V13-H γ^h)		
C14	pro-(<i>S</i>)	pro-(<i>R</i>)	-60°	-	-

* aus dem Vergleich mit weiteren formstabilen Epitopen gewonnen (siehe Anhang 8.1).

Das vorliegende β -*hairpin*-Design befestigt konformationelle Epitope auf dem von COCHRAN und Mitarbeitern entwickelten hydrophoben Cluster. Die meisten Seitenkettenrotamere können direkt aus den einzelnen NMR-Spektren der so gewonnen, formstabilen Peptidantigene bestimmt werden. Über dies hinaus ermöglicht der Ansatz, eine ganze Reihe von ähnlichen Konformationen und deren Seitenkettenrotameren zu untersuchen, wobei eben auch ein Set von

Abschließend wird auf die Seitenkettenausrichtung des Tryptophans im Referenzpeptid **1** eingegangen. Es nimmt eine zentrale Rolle für die Stabilität des β -*hairpins* ein und ist Bestandteil des hydrophoben Clusters, wobei der Indolring in positive Wechselwirkung mit der gegenüberliegenden, aliphatischen L12-Seitenkette tritt. Globale Änderungen in der Konformation des β -*hairpins* sollten dementsprechend auch mit einer Änderung der W3-Indol-Ausrichtung einhergehen. Um auch hierfür eine Referenz für spätere Vergleiche zur Verfügung zu haben (siehe Kapitel 3.10), wurden dementsprechend die NOE-Kontakte (zusätzlich zum zuvor bestimmten Seitenkettenrotamer) ausgewertet. Sie sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Der Indolring liegt zentral auf der Unterseite des *hairpins*, wobei die Seite des stickstoffhaltigen Fünfrings Richtung terminaler Enden zeigt, während der Sechsring in Richtung Mitte des *hairpins* (E4, S10, R11) orientiert ist.



3.4 ELISA-Tests und deren Optimierung

Nach der detaillierten Konformationsanalyse wurde die räumliche Struktur mit der Affinität gegenüber RA-Autoantikörpern korreliert. Dafür dienten ELISA-Tests (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Es handelt sich dabei um ein immunologisches Nachweisverfahren, bei dem man sich die hohe Spezifität von Antikörper-Antigen-Bindungen zu Nutze macht: Antigen und Antikörper werden dabei an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Findet eine Erkennung statt kann sie entweder über eine enzymatische Farbreaktion oder über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen werden.^[281] Dabei gibt es verschiedene Arten von ELISA-Tests, abhängig von der Reihenfolge, in der Antigen und Antikörper an die Polystyroloberfläche der ELISA-Platte gebunden werden, und welche Reagenzien zum Sichtbarmachen der Reaktion verwendet werden.

Die Oberfläche der in dieser Arbeit verwendeten Mikrotiterplatte (*Corning DNA Bind*) ist mit kovalent gebundenen *N*-Oxysuccinimidester-Gruppen funktionalisiert. Als erstes wird das Peptidantigen somit in einer nucleophilen Substitution über eine freie Aminofunktion angebracht (Abbildung 3.11). Elementare Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein eines primären Amins, das außerdem räumlich entfernt vom Epitop und dessen Hapten platziert ist. Diese Art der Anbindung bringt den Vorteil einer hohen Homogenität und Reproduzierbarkeit mit sich. Es gibt keine Möglichkeit, die Anbindung vor der abschließenden Farbreaktion (s.u.) analytisch nachzuweisen.

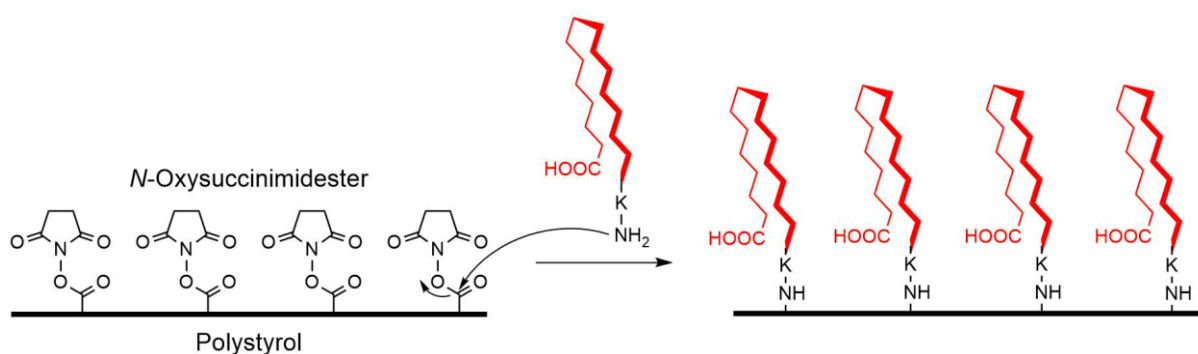


Abbildung 3.11. Kovalente Anbindung der Peptidepitope an die Mikrotiterplatte (vereinfachtes Schema).

Das weitere Vorgehen erfolgt wie in Abbildung 3.12 schematisch gezeigt (Details finden sich im experimentellen Teil wieder): Anschließend wird mit dem primären, polyklonalen RA-Autoantikörper inkubiert. Da eine Bindungsquantifizierung über diesen nicht möglich ist, wird ein sekundärer, Enzym-konjugierter Antikörper verwendet, der den Fc-Teil des primären,

humanen Antikörpers erkennt (anti-human IgG-Antikörper). Bei dem Enzym handelt es sich um eine Peroxidase, die das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Anwesenheit von H_2O_2 umsetzt. Die dabei entstehende Blaufärbung wird mit H_2SO_4 (5% in Wasser) als Fixierlösung beendet und ein Farbwechsel nach gelb herbeigeführt. Durch eine Absorptionsmessung bei 450 nm kann dann indirekt die Affinität der Antigen-Antikörper-Bindung gemessen werden.

In der Vorarbeit von SABRINA FISCHER wurden für die Konformationsanalyse 14er-Peptide verwendet, während in den ELISA-Tests 22er-Peptide genutzt wurden.^[280] In der Masterarbeit von ANDREAS SCHRIMPF konnte gezeigt werden, dass das 15er-Peptid **1** (14er plus N-terminales Lysin) unter Beibehalt der konformationellen Stabilität ebenfalls sehr gute Absorptionswerte in ELISA-Tests zeigt, wenn es gegen den anti-CCP-Antikörper getestet wurde.^[282] Dieser Befund sollte nun untermauert und im Vergleich zu verschiedenen weiteren, N- und C-terminal modifizierten Epitopen getestet werden, um eine verlässliche und optimierte Methodik für alle folgenden ELISAs zu entwickeln.

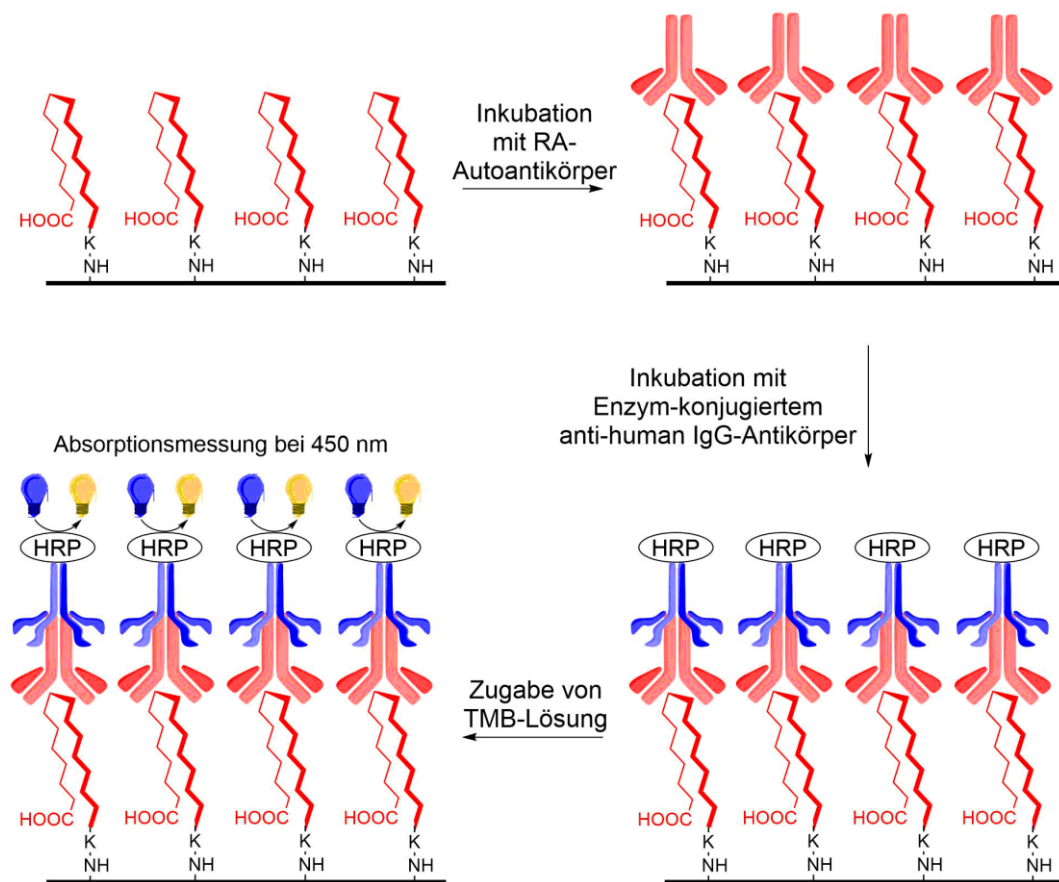


Abbildung 3.12. Schematischer Ablauf des in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Tests.

Dafür wurden neben dem Referenzpeptid **1** das N-terminal mit Gly (statt Lys) versehene Peptid **2**, außerdem das 14er-Peptid **3**, ein 15er-Peptid **4**, das N-terminal 6-Aminohexansäure (Ahx) statt Lys enthält, ein 16er-Peptid **5**, das N-terminal sowohl um Ahx als auch Lys verlängert wurde, sowie ein 15er-Peptid **6**, bei dem Lys an den C-Terminus addiert wurde, verwendet. Die ^1H -NMR-Spektren (Abbildung 3.13) zeigen im NH- und Leu-Signalbereich an, dass die N- bzw. C-terminalen Veränderungen keine grundlegenden Veränderungen der Verschiebungen mit sich führen. Dies zeigt einen besonderen Vorteil des hydrophoben Clusters (CHWE/RLVC) als stabilisierendes β -hairpin-Designelement, da gewünschte Veränderungen in anderen Bereichen des Peptids zu keiner globalen Änderung der *hairpin*-Konformation führen. So bleiben alle Spezies im ELISA-Test gut vergleichbar und die erhaltenen Absorptionswerte sind, im Besonderen in diesem Zusammenhang, auf die Anbindung der N- oder C-terminalen Aminosäure mit primären Aminofunktionen an die Platte zurückzuführen.

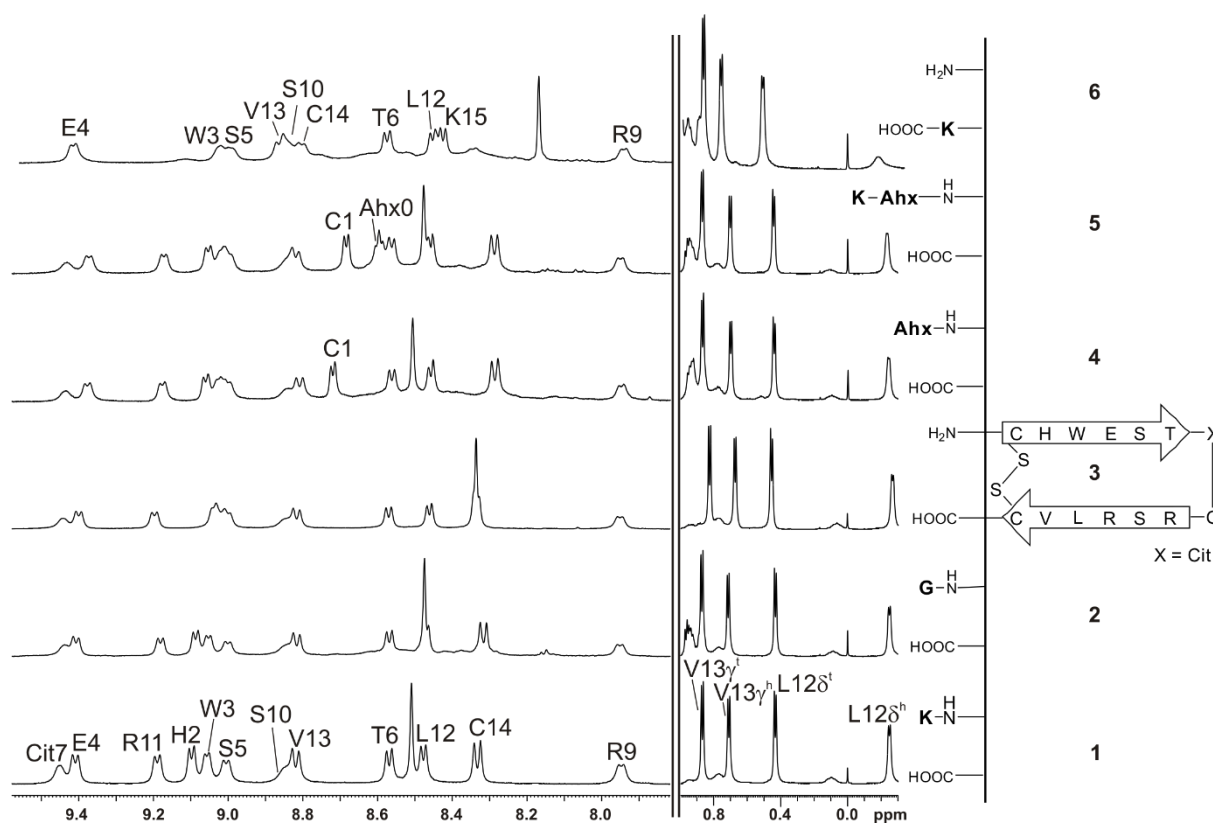


Abbildung 3.13. NH- und Leu-Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1) der N- und C-terminal modifizierten Peptide **1-6**. Veränderungen im Vergleich zu Referenzpeptid **1** (ganz unten) oder zusätzlich auftretende Aminosäuresignale sind beschriftet.

Die Ergebnisse der ELISA-Tests gegen den anti-CCP-Antikörper sind in Abbildung 3.14 als Balkendiagramm einzusehen. Die Absorption ist relativ zum besten (= höchste Absorption) Antigen **1** angegeben, um eine bessere Vergleichbarkeit unter allen vermessenen Peptiden und eine höhere Reproduzierbarkeit zu erlauben. Außerdem werden auf diese Weise Inhomogenitäten in den verwendeten Serenchargen berücksichtigt (Absolutwerte von Referenzpeptid **1** beim Testen gegen verschiedene Serenchargen umfassen 0.50 bis 2.00). Die Unterschiede in der Absorption können durch die gewählte Methodik direkt in eine Anbindungsrate an die Platte übersetzt werden. Peptidantigene gelten als inaktiv, wenn sie nicht mindestens 15% der Absorption von Peptid **1** erreichen.

Die Peptide **1** und **5** zeigen die höchsten Absorptionswerte. Das gemeinsame Merkmal ist ein N-terminales Lysin, welches in Peptid **5** durch ein zusätzliches Ahx weiter vom Peptidrückgrat entfernt angebracht ist. Ein N-terminales Glycin in Peptid **2** oder ein C-terminales Lysin in Peptid **6** zeigen eine um ein Drittel geringere Absorption. Peptid **4** mit Ahx am N-Terminus erreicht sogar nur etwa ein Drittel der Anbindung von **1**, obwohl auch hier ein primäres Amin vorhanden ist, das durch eine C₆-Alkylkette vom *backbone* getrennt wird. Wie das 14er-Peptid **3** beweist, ist keine kovalente Verknüpfung an die funktionalisierte Polystyroloberfläche ohne zusätzliche N- oder C-terminale Aminosäure möglich.

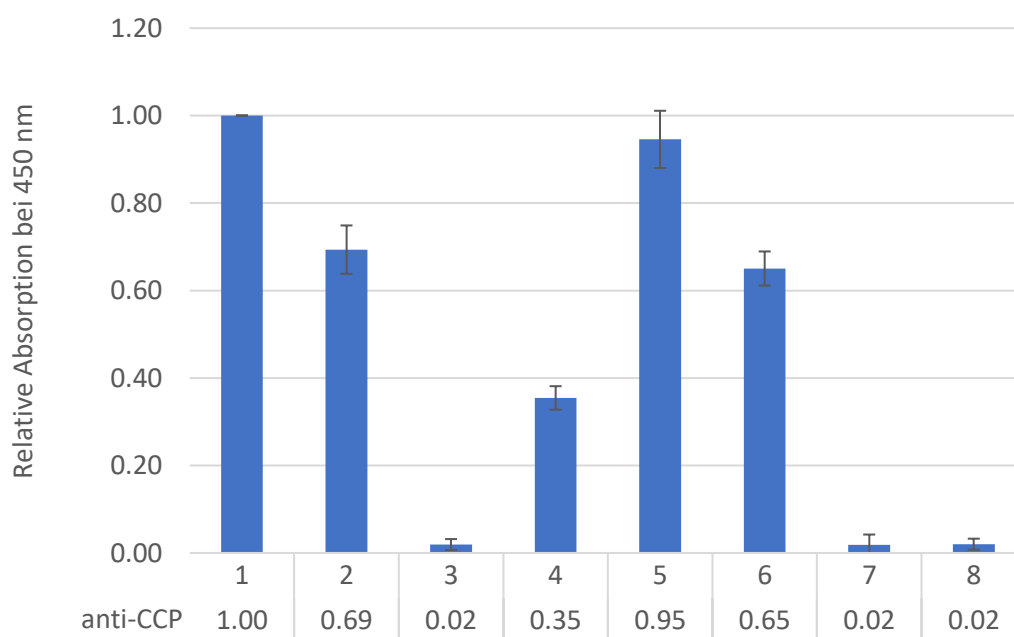


Abbildung 3.14. Ergebnisse der ELISA-Tests der N- und C-terminal variierten Peptide **1-6**, **7** (Cit7→R) und **8** (R9,R11→Cit) in Form eines Balkendiagramms. Die Absorption ist relativ zum affinsten Peptidepitop **1** angegeben.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein Lysin direkt (ohne *Spacer*) an das N-terminale Cystein gebunden werden kann, sodass eine bestmögliche Anbindung erhalten wird. Dabei scheint das Lys-NH ζ in der Seitenkette das entscheidende Merkmal zu sein. Dagegen führt die Einbringung des Glycins, das nur das NH α aufweist, aber keine Seitenkette, oder der 6-Aminohexansäure, die zwar ein vom *backbone* entferntes Amin, aber ebenfalls kein Stereozentrum enthält, zu einer schlechteren Anbindung. Andere, ergänzende Mutationen sind folglich nicht notwendig und führen meistens sogar zur schlechteren Oberflächenverknüpfung. Diesen Ergebnissen entsprechend konnte das Peptidepitop **1** mit N-terminalem Lysin (fortan nummeriert als K0, vgl. Abbildung 3.3) sowohl als Konformations- als auch als ELISA-Referenz verwendet werden. Das Ziel der Optimierung der Gesamtmethodik wurde erreicht und der Einfluss von eingeführten Mutationen war sehr gut vergleichbar.

3.4.1 Arginin oder Citrullin? Die Validität der ELISA-Tests

Um die Validität der durchgeführten ELISA-Tests zu bestätigen, wurde Peptid **7** synthetisiert, das wie **1** eine stabile β -*hairpin*-Konformation ausbildet (analytische Daten im experimentellen Teil), anstelle des für die Affinität essentiellen Citrullins aber ein Arginin im *turn* enthält (K⁰C¹HWESTR⁷GR⁹SR¹¹LVC¹⁴). Wie erwartet wird es von den anti-CCP-Antikörpern nicht erkannt (Abbildung 3.14). Obwohl die diagnostische Spezifität der anti-CCP-Antikörper sehr hoch ist, kommt es in einigen Fällen vor, dass nicht-RA-Seren Zielmoleküle in einem Citrullin-unabhängigen Modus erkennen.^[109,283,284] Dabei werden Peptide durch enthaltene Arginine (statt Citrullin) durch im Blutserum auftretende Antikörper genauso effizient gebunden wie CCPs durch anti-CCP-Antikörper. Die Verwendung eines formstabilen, nicht-citrullinierten Peptidantigens, das Arginin in der ursprünglichen Haptenposition beinhaltet, könnte die Qualität eines diagnostischen RA-Tests also noch weiter verbessern. Epitop **7** würde sich für diesen Zweck dementsprechend bestens eignen. Bei einem Patienten, der sowohl auf Peptid **7** als auch auf ein CCP positiv getestet würde, könnte somit eine falsch positive Aussage verhindert werden.

Den ladungstechnischen 'Gegenspieler' stellt Peptidepitop **8** dar, bei dem alle Arginine durch Citrulline ausgetauscht wurden. Ein solches Epitop wurde in der Masterarbeit von ANDREAS SCHRIMPF als 14er- und 22er-Variante synthetisiert^[282] und hier unter den allgemeinen Bedingungen der 15 Aminosäuren umfassenden Antigene reproduziert (K⁰C¹HWESTCit⁷GCit⁹SCit¹¹LVC¹⁴). Dabei bleibt die β -*hairpin*-Konformation erhalten (ein vollständiges ¹H-NMR-Spektrum ist im experimentellen Teil abgebildet), während die

biologische Aktivität gegenüber anti-CCP-Antikörpern verloren geht (Abbildung 3.14), was auf das stark veränderte Ladungsmuster zurückgeführt werden kann.^[285,286] Für anti-CCP-Antikörper stellt also auch dieses Epitop eine Negativkontrolle dar. Gleichzeitig präsentiert es mehrere Citrulline in unterschiedlicher chemischer Umgebung innerhalb einer einzelnen Sequenz und ist damit ein Kandidat für Tests gegen Patientenseren, um bisher unerkannte Antikörper zu identifizieren.

3.5 Paarweise korrelierte D-Aminosäuren

Die Beschaffenheit eines β -*hairpins* mit direkt gegenüberliegenden Aminosäuren, die sich abwechselnd in Wasserstoffbrücken-gebundenen und nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Positionen befinden, ermöglicht ein korreliertes, modulares Mutationskonzept der entsprechenden Paare. Die hier beschriebene Einführung von D-Aminosäuren ist ein ausgewähltes Beispiel für dieses modulare Mutationskonzept und zeigt die Stärken und die Übertragbarkeit des gewählten Ansatzes auf synthetische, konformationelle *hairpin*-Epitope. Gleichzeitig werden die in Kapitel 3.3 gezeigten analytischen Techniken konkret auf die Konformations-Affinitäts-Beziehung der Peptidepitope angewendet. Durch die Rigidifizierung der Peptidepitope wird das Bindungsmodell in Richtung Schlüssel-Schloss-Prinzip vereinfacht, sodass Informationen über die gebundene Konformation im Antikörper-Antigen-Komplex gewonnen werden können.

D-Aminosäuren ermöglichen, dass die chemische Funktionalität eines Peptids nicht beeinflusst wird und somit nur die Konformation, respektive die Ausrichtung der Seitenketten, verändert und direkt mit der biologischen Aktivität korreliert werden kann (siehe Einleitung 1.5). Der Einbau einer einzelnen oder auch mehrerer D-Aminosäuren in das Peptid resultiert normalerweise in der Destabilisierung der Peptid-Sekundärstruktur, im Besonderen, wenn sie in sequentiell benachbarten Positionen eingebracht werden.^[135,136] DURANI *et al.* berechneten und entwarfen stabile Peptidstrukturen am Computer und verwendeten D-Aminosäuren auf gegenüberliegenden β -*sheet*-Strängen für das *de novo*-Design von Enzym-Mimetika.^[287,288] In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendbarkeit von D-Aminosäuren noch wesentlich weiter ausgeschöpft und in einer paarweise korrelierten Mutationsfolge auf direkt gegenüberliegenden Positionen eines antiparallelen β -*sheets* eingesetzt.^[289] Das Ziel war das konformationelle 'Abknicken' (um 90°) des *hairpin*-Gerüsts, sodass die strukturellen Eigenschaften des Peptidepitops unter gleichzeitigem Beibehalt einer Vorzugskonformation in Lösung deutlich verändert werden. Es wurde dabei ein modulares Design verwendet, dass das biologisch aktive

Rheumaepitop, einschließlich des Haptens Citrullin, mit dem hydrophoben COCHRAN-Cluster, einer Disulfidbrücke und der paarweise korrelierten D-Aminosäuren kombiniert (Abbildung 3.15).

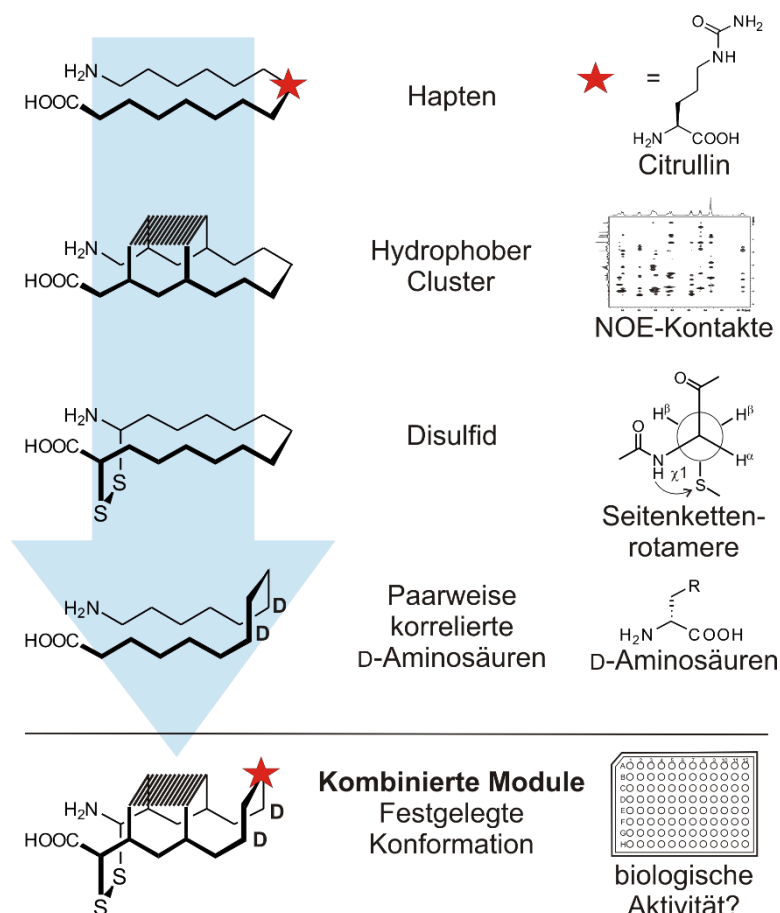


Abbildung 3.15. Das verwendete, modulare Design kombiniert die verschiedenen aufgeführten Designelemente miteinander und führt zu konformationell eingeschränkten Epitopen mit dem Doppel-D-Motiv. Jedes Modul trägt mit einer spezifischen, korrelierten Eigenschaft zur Konformationsgestaltung bei. Mit analytischen Methoden (NMR, ELISA) werden Konformation und biologische Aktivität in Beziehung gesetzt.^[289]

Das natürlich vorkommende, cyclische Lipopeptid Daptomycin, ein Antibiotikum gegen grampositive Bakterienstämme, inspirierte das Konzept dabei mit seinem korrelierten Doppel-D-Motiv (Abbildung 3.16 A).^[290] Der COCHRAN-Cluster stabilisiert die *hairpin*-Bildung und zyklisiert das Peptid über eine Disulfidbrücke (Abbildung 3.16 B). Das cyclische, citrullinierte Filaggrinpeptid cfc1-cyc (Abbildung 3.16 C) enthält das Epitop, das für die Erkennung durch RA-Antikörper notwendig ist. Durch Verknüpfung des natürlich inspirierten Designs (A) mit einem konformationell stabilen Gerüst (B) und einer biologisch aktiven Komponente (C) werden neue Peptidfaltungen erschaffen und der konformationelle Raum von Peptidepitopen

(im Speziellen die Ausrichtung und Umgebung des *hairpin*-Epitops, seines *turns* bzw. des darin enthaltenen Cit wurden in diesem Zusammenhang untersucht) und deren zugehörigen Antikörperparatopen erforscht.

Wenn ein einfacher 'Knick' des *backbones*, verursacht durch eine einzelne D-Aminosäure, nicht durch eine zweite, korrelierte D-Mutation kompensiert wird, sollte der hydrophobe Cluster gestört werden und die Ausbildung einer formstabilen Konformation misslingen. Gleichzeitig sollte sich ohne kooperative Kompensation auch die Affinität des Peptidepitops verringern. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden neben den Doppel-D-Varianten auch Mono-D-Derivate als wichtige Kontrollpeptide synthetisiert. Ausgehend von all-L-Referenzpeptid **1** zeigte sich bei Mono-D-Peptid **9** (T6→t6, Abbildung 3.16 D) der destabilisierende Effekt einer einzelnen D-Aminosäure, gekennzeichnet durch einen Signaldispersionsverlust im ¹H-NMR. Die korrelierte Doppelmutation (Peptid **10**, T6→t6, R9→r9, Abbildung 3.16 E) hatte auf der Basis der Signaldispersion wiederum einen stabilisierenden Einfluss und präsentierte eine definierte β -*hairpin*-Struktur. Damit war der *proof of principle* für die korrelierte Kompensation erbracht. Überraschenderweise wurde bei einer zweiten Mono-D-Variante **11** (R9→r9) keine Destabilisierung beobachtet, sondern, im Gegenteil, eine hochpopulierte β -*hairpin*-Konformation (das vollständige ¹H-NMR-Spektrum ist im experimentellen Teil einsehbar). Die D-Aminosäure in Position 9 passt unerwarteterweise sehr gut zum globalen *twist* des β -*hairpins*. Es kann geeignete ϕ - und ψ -Winkel annehmen, die auf die inhärente kooperative Akkordeonbewegung des *hairpins* abgestimmt sind. Das benachbarte Glycin in Position 8 besitzt eine hohe Flexibilität in Bezug auf erlaubte ϕ - und ψ -Winkel-Kombinationen und erleichtert damit die Anpassung an den eingeführten Knick. Dieser Befund scheint, auch im Vergleich mit entsprechenden Literaturquellen,^[135,136] eine Ausnahme der Regel darzustellen und ist, wie zuvor beschrieben, nicht für die Mutation T6→t6 in Peptid **9** beobachtbar.

Das Doppel-D-Design wurde eingehend untersucht und abwechselnd in Wasserstoffbrücken-gebundenen und nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Positionen eingeführt, wobei die *backbone*-Geometrie an der entsprechenden Stelle invertiert wird (über oder unter die *backbone*-Ebene). Tabelle 3.3 enthält alle synthetisierten Mono- und Doppel-D-Peptide zusammen mit konformationellen Eigenschaften und den erhaltenen Absorptionswerten in ELISA-Tests.

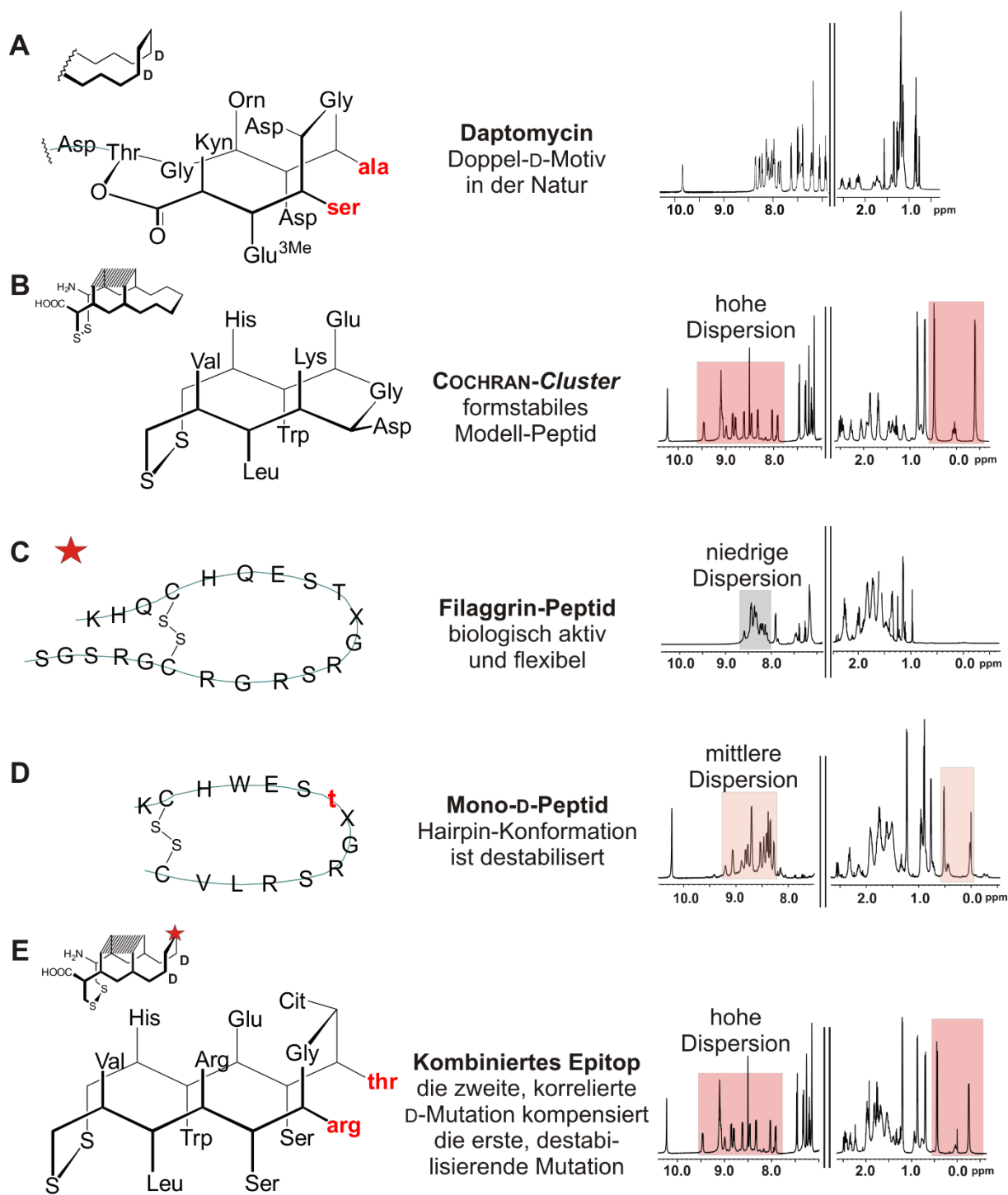
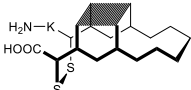
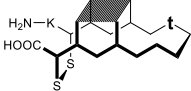
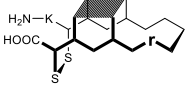
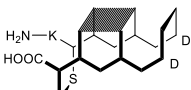
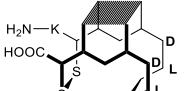
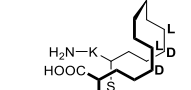
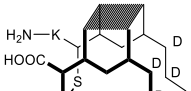
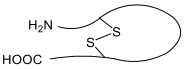


Abbildung 3.16. Peptidsequenzen, die dem paarweise korrelierten D-Aminosäure-Design zugrunde liegen. Die ^1H -NMR-Spektren liefern einen Fingerabdruck der Peptide und zeigen Vorzugskonformationen in Lösung durch die Signaldispersion an (600 MHz, wässrige Lösung, Daptomycin (A): 0.20 M $[\text{D}_{25}]\text{SDS}$).^[289] Kyn: Kynurenin, Glu^{3Me}: 3-Methylglutamin.

Tabelle 3.3. Synthetisierte Mono- und Doppel-D-Peptide (X: L-Cit), postulierte sowie NMR-abgeleitete konformationelle Charakteristika und Absorptionswerte (normalisiert auf Peptid **1**), die in ELISA-Tests mit den entsprechenden RA-Autoantikörpern erhalten wurden (ein zugehöriges Balkendiagramm findet sich weiter unten in Abbildung 3.26).^[289]

Peptidsequenz	Postulierte Struktur	Absorption (ELISA)		NMR-abgeleitete Struktur und Korrelation
		anti-CCP	anti-Sa	
1 $\begin{array}{c} \text{K}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{E}-\text{S}-\text{T}-\text{X} \\ \\ \text{C}-\text{V}-\text{L}-\text{R}-\text{S}-\text{R}-\text{G} \end{array}$		1.00	1.00	all-L- β -hairpin, hohe Affinität
9 $\begin{array}{c} \text{K}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{E}-\text{S}-\text{t}-\text{X} \\ \\ \text{C}-\text{V}-\text{L}-\text{R}-\text{S}-\text{R}-\text{G} \end{array}$		0.53	0.81	Mono-D, destabilisierte hairpin-Konformation
11 $\begin{array}{c} \text{K}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{E}-\text{S}-\text{T}-\text{X} \\ \\ \text{C}-\text{V}-\text{L}-\text{R}-\text{S}-\text{r}-\text{G} \end{array}$		1.00	0.98	Mono-D, formstabiler β -hairpin, ähnlich 1
10 $\begin{array}{c} \text{K}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{E}-\text{S}-\text{t}-\text{X} \\ \\ \text{C}-\text{V}-\text{L}-\text{R}-\text{S}-\text{r}-\text{G} \end{array}$		0.09	0.33	Doppel-D, β -hairpin mit invertiertem turn, Anti-körperunterscheidung möglich
12 $\begin{array}{c} \text{K}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{E}-\text{s}-\text{T}-\text{X} \\ \\ \text{C}-\text{V}-\text{L}-\text{R}-\text{s}-\text{R}-\text{G} \end{array}$		0.07	0.26	β -hairpin mit ungewöhnlicher Faltung, erweitert Doppel-D-Design
13 $\begin{array}{c} \text{K}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{e}-\text{S}-\text{T}-\text{X} \\ \\ \text{C}-\text{V}-\text{L}-\text{r}-\text{S}-\text{R}-\text{G} \end{array}$		0.14	0.36	random coil, Anti-körperunterscheidung möglich, kein Rückschluss auf die Anti-körper-gebundene Konformation
14 $\begin{array}{c} \text{K}-\text{C}-\text{H}-\text{W}-\text{E}-\text{s}-\text{t}-\text{X} \\ \\ \text{C}-\text{V}-\text{L}-\text{R}-\text{s}-\text{r}-\text{G} \end{array}$		0.16	0.09	Zwei Doppel-D-Module, stabiler β -hairpin mit ungewöhnlicher Faltung; Negativkontrolle
cfc1-cyc $\begin{array}{c} \text{K}-\text{H}-\text{Q}-\text{C}-\text{H}-\text{Q}-\text{E}-\text{S}-\text{T}-\text{X} \\ \\ \text{S}-\text{G}-\text{S}-\text{R}-\text{G}-\text{C}-\text{R}-\text{G}-\text{R}-\text{S}-\text{R}-\text{G} \end{array}$		0.65	0.74	random coil, cfc1-cyc; Literatur-bekannt

Die Konformationen wurden mittels CD- und im Detail mittels NMR-Spektroskopie bestimmt (Kapitel 3.5.1) und in ELISA-Assays gegen zwei kommerziell erhältliche RA-Autoantikörper, nämlich anti-CCP und anti-Sa, getestet (entsprechende Balkendiagramme sind weiter unten in Abbildung 3.26 abgebildet). Über dies hinaus sind die postulierten Strukturen als vereinfachte Zickzackdiagramme dargestellt (ohne den rechtsgängigen *twist*), die den erheblichen Einfluss der korrelierten Doppel-D-Modifikation auf die *backbone*-Geometrie hervorheben.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mono-D-Derivaten **9** (t6) und **11** (r9) sowie Doppel-D-Peptid **10** (t6, r9, in H-Brücken-Position) wurden dementsprechend weitere Doppel-D-Mutanten synthetisiert, um Aussagen über Nützlichkeit und Anwendbarkeit des paarweise korrelierten D-Aminosäure-Designs treffen zu können. Peptid **12** mit s5,s10 in nicht-H-Brücken-Position zeigte eine ungewöhnliche *hairpin*-Vorzugskonformation an. Peptid **13** dagegen, mit e4,r11 erneut in H-Brücken-Position, nimmt eine *random coil*-Struktur in Lösung an. Ein Tetra-D-Epitop **14** (t6,r9,s5,s10) mit zwei kombinierten Doppel-D-Modulen wurde ebenfalls synthetisiert. Die spektroskopischen Daten offenbaren alle Anzeichen einer intakten *hairpin*-Struktur mit einem zweifachen Knick. Es besitzt keine biologische Aktivität, sodass es sich auch als (konformationelle) Negativkontrolle für die Affinitätstests eignet. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde außerdem das Literatur-bekannte **cfc1-cyc** verwendet.^[84]

3.5.1 Detaillierte Konformationsanalyse der Mono- und Doppel-D-Peptide

Um Informationen über globale konformationelle Eigenschaften aller Peptide zu erhalten, wurden neben NMR-Spektren auch CD-Spektren der Peptide aufgenommen (Abbildung 3.17). Das Spektrum des all-L-*hairpin* **1** (schwarz) zeigt eine antiparallele β -*sheet*-Konformation^[291] mit einem Elliptizitäts-Minimum bei 216 nm und einem schwachen Maximum bei 233 nm. Die Mono-D-Peptide **9** (t6, rot) und **11** (r9, hellgrün) zeigen etwas schwächere Minima und ähnliche Maxima. Doppel-D-Variante **10** (t6,r9, blau) besitzt Extrema bei den gleichen Wellenlängen. Trotz der invertierten Stereokonfiguration beweisen die CD-Spektren (unabhängig von den NMR-Daten) die konformationelle Ähnlichkeit der eben genannten Peptide. Doppel-D-Peptid **12** (s5,s10, lila) und Tetra-D-Variante **14** (t6,r9,s5,s10, dunkelgrün) zeigen relativ starke Maxima bei 227 nm und ein intensives Minimum bei 202 nm, was auf einen näheren Zusammenhang dieser ungewöhnlichen *hairpin*-Konformationen untereinander als zu Doppel-D-Epitop **10** (t6,r9) hinweist. Die Spektren von Peptid **13** (e4,r11, orange) und **cfc1-cyc** (grau, jedoch mit deutlich intensiverem Minimum bei 199 nm) sind typisch für *random coil*-Strukturen, wiederum in Übereinstimmung mit den NMR-Daten (s.u.).

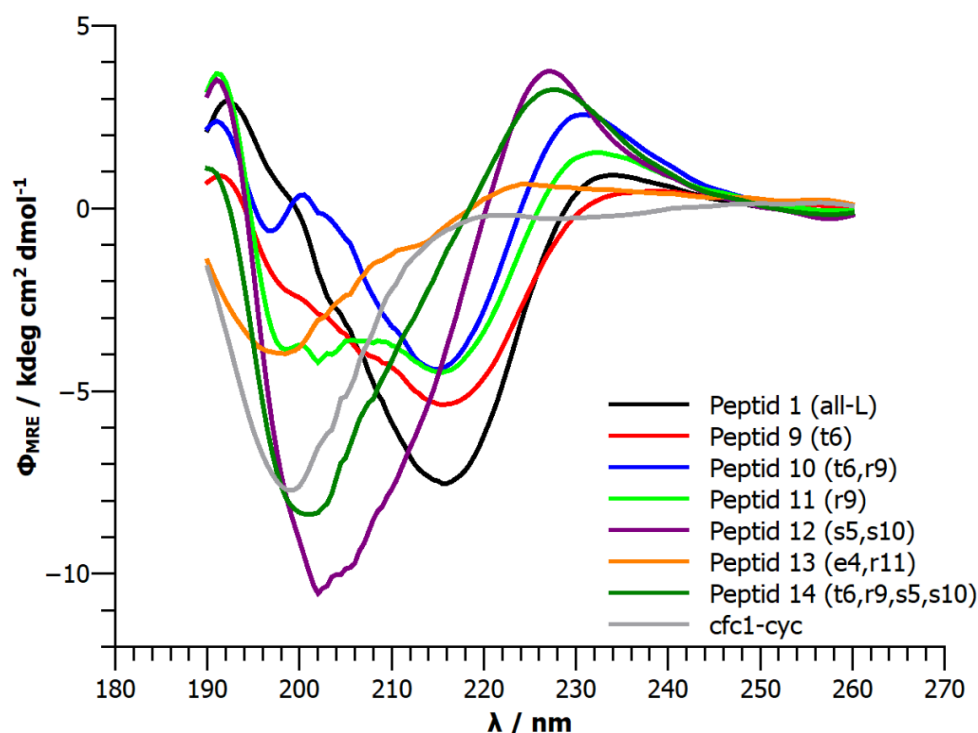


Abbildung 3.17. CD-Spektren der Peptide **1**, **9-14** und cfc1-cyc (200 μ M in wässriger Lösung).^[289]

Detailliertere Informationen ließen sich durch NMR-Spektren gewinnen, da die analytischen Daten atomaufgelöst erhalten werden. Die *interstrand-backbone*-NOE-Kontakte (vgl. Kapitel 3.3) geben Auskunft darüber, ob eine *hairpin*-Konformation vorhanden und intakt ist. Abbildung 3.18 zeigt diesen für das Mono-D-Peptid **11** (r9) zusammen mit den relevanten NOE-Spektrenausschnitten. Alle (!) erwarteten Kontakte sind bei dieser hochpopulierten β -*hairpin*-Spezies sichtbar. Das all-L-Peptid zeigt ein ähnliches Verhalten und wurde bereits in Kapitel 3.3, Abbildung 3.6, als Referenzpeptid eingehend diskutiert. In Abbildung 3.19 sind die entsprechenden LEWIS-Formeln für die komplementären Peptide **9** (t6) und **10** (t6,r9) einzusehen. Die Mono-D-Variante **9** zeigt räumliche Kopplungen vor allem zwischen den terminalen Bereichen der β -Stränge als auch im hydrophoben Cluster, nicht aber in den *turn*-nahen Regionen. Damit bestätigt sich, zusammen mit der geringeren Signaldispersion, die Destabilisation der Konformation durch die eingeführte D-Aminosäure, jedoch kein kompletter Verlust der β -*hairpin*-Struktur. Die zweite, korrelierte D-Aminosäure in Doppel-D-Peptid **10** kompensiert diese konformationelle Beeinträchtigung, was sowohl durch die hohe Signaldispersion als auch die fast vollständig beobachtbaren *interstrand-backbone*-NOE-Kontakte bestätigt wird.

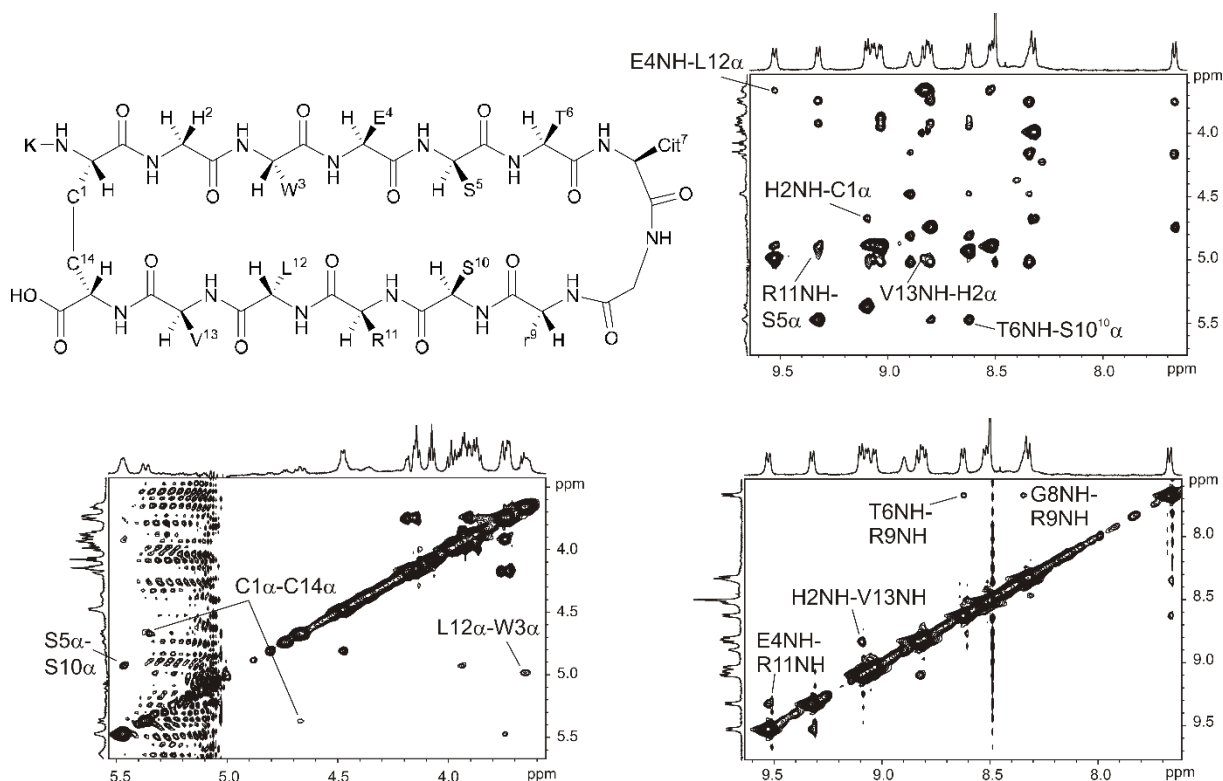


Abbildung 3.18. Interstrand-backbone-NOE-Kontakte, die für das Mono-D-Peptid 11 (r9) beobachtbar sind, und zugehörige NOE-Spektrenausschnitte (600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).^[289]

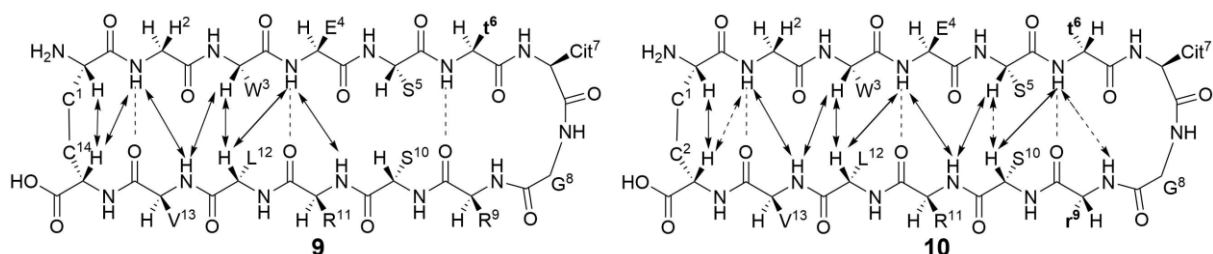
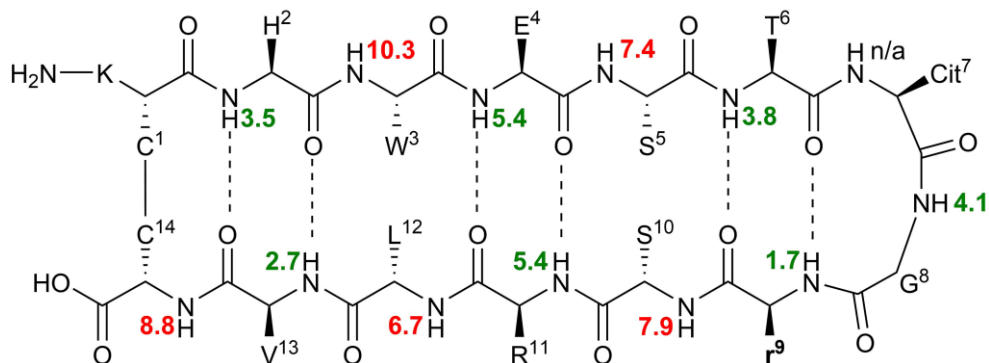


Abbildung 3.19. Interstrand-backbone-NOE-Kontakte, die für das Mono-D-Peptid 9 (t6, links) und das Doppel-D-Peptid 10 (t6, r9, rechts) beobachtbar sind. Gestrichelte Pfeile kennzeichnen nicht eindeutig zuordenbare Kontakte (durch Überlappung von Signalen).^[289]

Die temperaturabhängige Verschiebung der amidischen ¹H-NMR-Signale ($\Delta\delta/\Delta T$ in ppb/K) liefert ergänzende Infos. Auch hier sind die zugehörigen NMR-Spektren beispielhaft für β -hairpin-Peptid 11 (r9) in Abbildung 3.20 dargestellt. Die charakteristische Abfolge von H-Brücken-gebundenen und nicht-H-Brücken-gebundenen Positionen dieser Konformation spiegelt sich in den alternierend großen und kleinen Temperaturgradienten von 11 wider.



Chemical structures of cyclic peptides **9** and **10** are shown. Structure **9** is a 14-membered cyclic peptide with residues: H₂N-K, C¹, H², Hn/a, W³, E⁺, S⁵, H⁶, Cit⁷, NH^{6.0}, G⁸, R⁹, H^{8.6}, S⁵, L¹², V¹³, and C¹⁴. Structure **10** is a 15-membered cyclic peptide with residues: H₂N-K, C¹, H², Hn/a, W³, E⁴, S⁵, H⁶, Cit⁷, NH^{6.0}, G⁸, R⁹, H^{8.4}, S¹⁰, L¹², V¹³, and C¹⁴. Both structures include NMR data (chemical shifts in ppm) for various protons: H² (6.6, 10.7), H⁶ (6.0, 8.3), H^{8.6} (8.6, 5.3), H^{8.4} (8.4, 2.3), H^{9.4} (9.4, 8.9), H^{10.5} (10.5, 7.0), H^{11.0} (11.0, 4.7), H^{12.0} (12.0, 3.1), H^{13.0} (13.0, 7.2), and H^{14.0} (14.0, 3.1).

72

Die Temperaturgradienten von **9** und **10** bestätigen, was bereits durch die Signaldispersion im Allgemeinen und die *interstrand-backbone*-Kontakte im Speziellen erkannt wurde: Das Mono-D-Peptid **9** (t6) zeigt keine eindeutig unterscheidbare, abwechselnde Folge von kleinen und großen ($\Delta\delta/\Delta T$)-Werten, während die Doppel-D-Mutante **10** mit zwei korrelierten D-Aminosäuren (t6,r9) wieder das typische β -*hairpin*-Muster anzeigt (Abbildung 3.21).

Abschließend wurden noch die *turn*-Strukturen der Mono-D-Peptide **9** (t6) und **11** (r9) sowie der Doppel-D-Spezies **10** (t6,r9) untersucht. Da der *turn* das Hapten Citrullin enthält, sind konformationelle Details über diesen Abschnitt des *hairpins* von besonderem Interesse. Während in all-L-Referenzpeptid **1** das G8-NH in *i*+2-Position durch den *turnflip* (siehe Kapitel 3.3) im ^1H -NMR nicht vorhanden ist, steht diese Information für die gerade genannten D-Mutanten zur Verfügung und macht eine eingehende *turn*-Analyse überhaupt erst möglich. In Abbildung 3.22 sind entsprechende NOESY-Spektren-Ausschnitte für das Doppel-D-Peptid **10** (t6,r9) dargestellt, diejenigen für die anderen drei Peptide finden sich im Anhang (Kapitel 8.2) wieder. Die Kontakte G8NH-r9NH, Cit7H α -r9NH und Cit7H β -G8NH sowie die Konfiguration der Aminosäuren *i*+1- und *i*+2-Position (L und L; Glycin kann ϕ - und ψ -Winkel beider Konfigurationen annehmen) lassen auf einen *turn* des Typs βI schließen. Interessanterweise ist das Glycin-Signal für dieses Peptid zwar auch verbreitert, jedoch scheint der konformationelle Austausch hier nicht so schnell wie für das Referenzpeptid **1** zu sein. Da sich die D-Aminosäuren in *i*- und *i*+3-Position befinden, erzeugen sie an dieser Stelle den Knick. Hier zeigen sich insbesondere NOE-Kontakte zwischen den S5,S10-H β und dem t6-H γ , die sich durch die invertierte Konfiguration nun auf der gleichen Seite der *backbone*-Ebene befinden und sich somit räumlich annähern. Wichtig ist dabei der Vergleich mit dem all-L- bzw. den Mono-D-Peptiden, die die entsprechenden Kontakte in dieser Kombination eben nicht aufweisen (siehe Anhang 8.2).

Alle genannten Details, sequentielle und *interstrand*-NOEs sowie Wasserstoffbrückenbindungen aus den temperaturabhängigen Verschiebungen der amidischen Protonen dienen als Grundlage für eine NMR-basierte Modellierung des Doppel-D-Peptids **10** im Vergleich zum all-L-Peptid **1**. Abbildung 3.23 offenbart den nahezu rechtwinkligen Knick des Peptid-*backbones* durch die zweifach invertierte Stereochemie. Gleichzeitig wird die Ausrichtung der Citrullin-Seitenkette verändert. Die resultierende Konformation ist wesentlich kompakter als diejenige von **1** und weist einen weniger ausgeprägten rechtsgängigen *twist* auf.

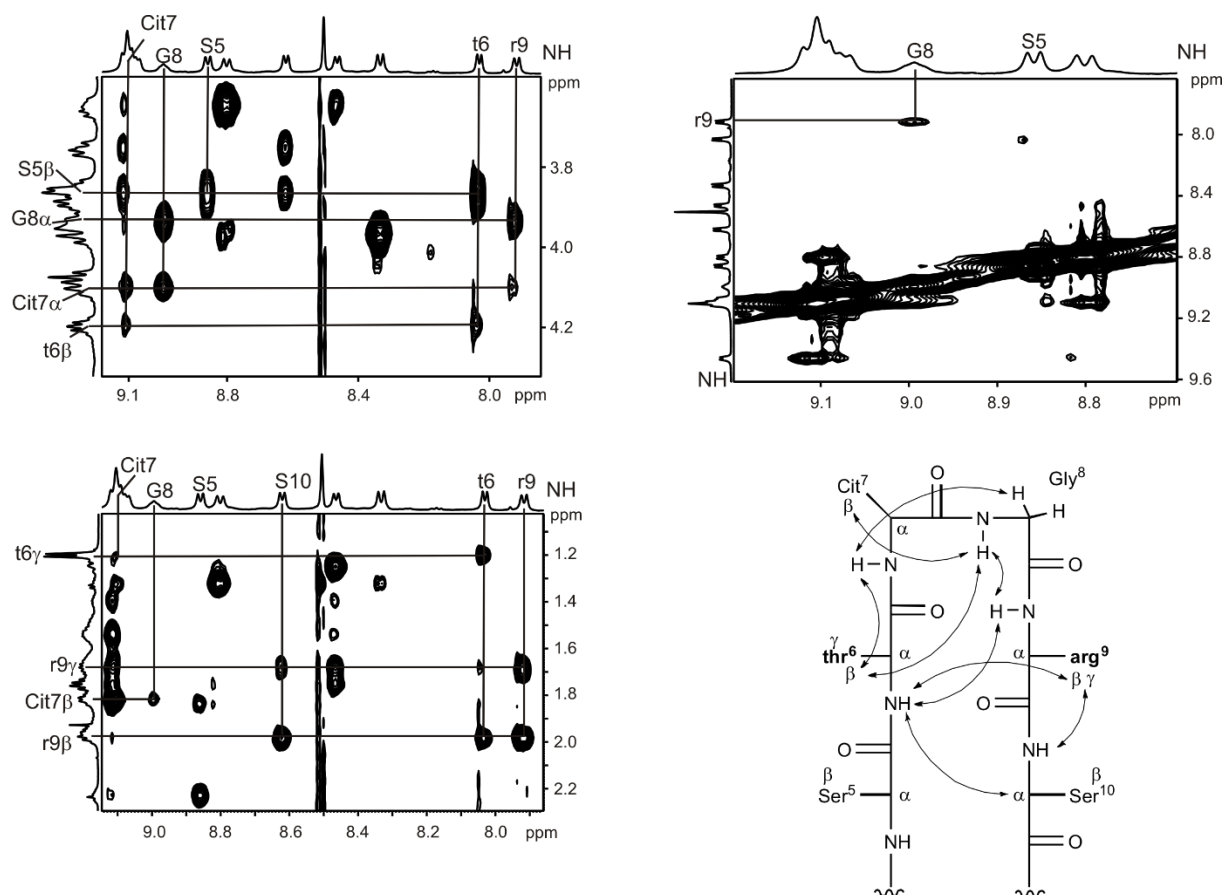


Abbildung 3.22. Ausschnitte aus den NOESY-Spektren des Doppel-D-Peptids **10** (t6,r9), die für die Aminosäuren im *turn* des β -hairpin relevant sind. Die ausgelesenen Kontakte sind unten rechts nochmals schematisch übersichtlich dargestellt.^[289]

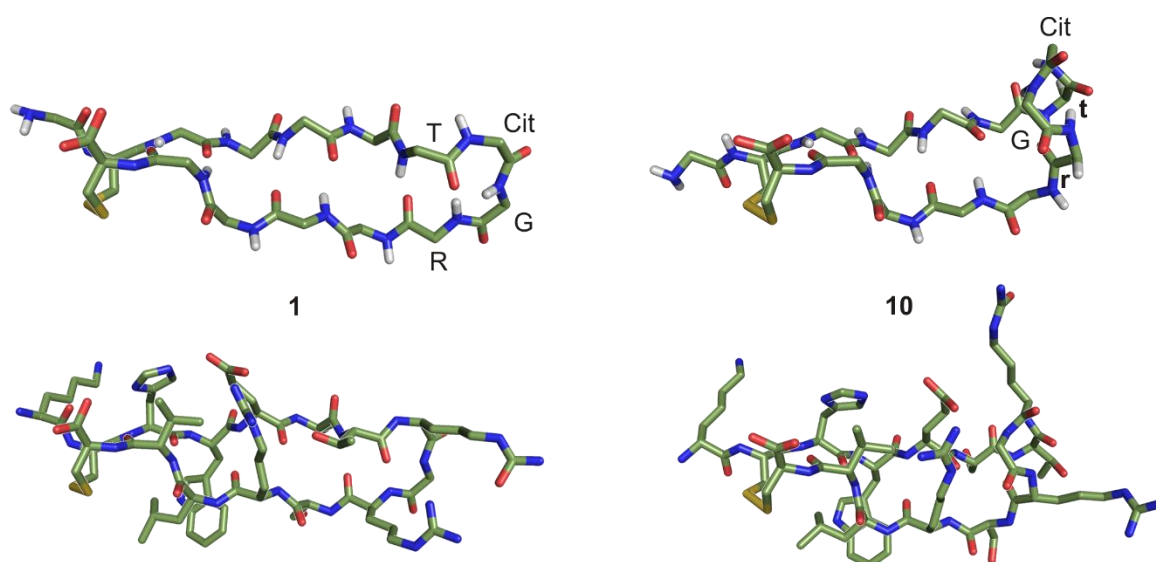


Abbildung 3.23. NMR-basiertes Modell des all-L-Peptids **1** (links) und des Doppel-D-Peptids **10** (t6, r9, rechts). *Backbone* (oben) und *Seitenketten* (unten).^[289]

Ebenso wurden Computermodelle der Mono-D-Varianten **9** (t6) und **11** (r9) erstellt, die in Abbildung 3.24 einzusehen sind. An diesen wird deutlicher, warum das D-Threonin in Position 6 die Konformation von *hairpin* **9** destabilisiert: die linksgängige Verdrillung des antiparallelen β -sheets wird durch den einfachen Knick in *i*-Position so stark beeinflusst, dass sie nicht mehr zu derjenigen des *turns* passt. Für Peptid **11** kann dieser Effekt durch das direkt vorhergehende Glycin und dessen Flexibilität kompensiert werden. Außerdem befindet sich der einfache Knick am Ende des *turns* in *i*+3-Position. Der hydrophobe Cluster ist davon nicht betroffen und unterscheidet sich kaum von Spezies zu Spezies.

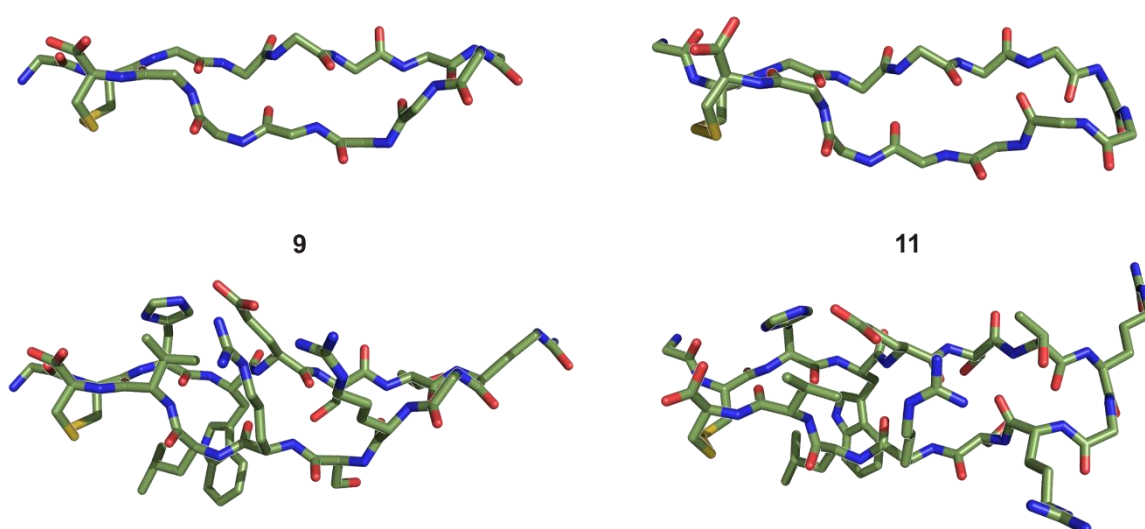


Abbildung 3.24. NMR-basiertes Modell des Mono-D-Peptides **9** (t6, links) und des Mono-D-Peptides **11** (t6, r9, rechts). *Backbone* (oben) und *Seitenketten* (unten).^[289]

3.5.2 Biologische Aktivität und antikörperselektive Antigene

Die Ergebnisse der ELISA-Tests aller Mono-, Doppel- und Tetra-D-Peptide gegen anti-CCP- und anti-Sa-Autoantikörper sind in Tabelle 3.3 aufgelistet (ein Balkendiagramm findet sich in Abbildung 3.26, s.u.). Nach der ausführlichen Konformationsanalyse, besonders des Doppel-D-Peptides **10** (t6,r9), im vorherigen Kapitel können die Änderungen in der räumlichen Struktur mit der Affinität in Beziehung gesetzt werden. Auf der Basis statistisch signifikanter Unterschiede konnten zwei Peptidgruppen identifiziert werden: Die erste, die die Peptide **1**, **9** und **11** umfasst, zeigte, in Übereinstimmung mit der formstabilen β -*hairpin*-Struktur (bzw. der Präferenz, diese Konformation auszubilden), hohe Absorptionswerte für beide Antikörper. Die gemessenen Affinitäten waren sogar höher als für das literaturbekannte **cfc1-cyc**,^[84] sodass sie

sich als potentielle Kandidaten für Standard-anti-CCP-Tests eignen. Die zweite Gruppe, die sich aus den Peptiden **10**, **12** und **13** zusammensetzt, wies keine bzw. eine geringe Affinität gegenüber anti-CCP-Antikörpern und eine mittlere Affinität gegenüber anti-Sa-Antikörpern auf. Da die stereochemischen Inversionen nur die *backbone*-Konformation und Seitenkettenorientierungen, nicht aber die funktionellen Gruppen selbst beeinflussen, kann diese Antikörperselektivität eindeutig den veränderten konformationellen Eigenschaften zugeschrieben werden. Die Daten lassen außerdem eine Zuordnung von Gruppe 1 als Antigene mit überlappender und von Gruppe 2 als Antigene mit nicht-überlappender Reaktivität bezüglich der verwendeten Antikörper zu.^[292]

Gleichzeitig implizieren diese Ergebnisse strukturelle Informationen über die beiden RA-Antikörper-Subtypen: der anti-CCP-Antikörper erkennt β -*hairpin*-Strukturen sehr gut und zeigt keine Affinität zu den geknickten Doppel-D-Strukturen. Anti-Sa-Antikörper binden beide Epitop-Typen. Dies deutet darauf hin, dass anti-CCP-Antikörper konformationsselektiv sind, während anti-Sa-Antikörper sich eher sequenzselektiv verhalten. Es soll nicht ohne Weiteres impliziert werden, dass die Konformation der formstabilen β -*hairpins* einhundertprozentig die rezeptorgebundene Struktur widerspiegelt. Die durch die modulare Epitopvariation gewonnenen konformationellen Daten stellen aber eine sehr gute Möglichkeit dar, um eine systematische Ligandenoptimierung bezüglich Affinität und Selektivität vorzunehmen. Direkte Struktur-Aktivitäts-Messungen (bspw. Kristallstrukturen der Immunkomplexe) stehen für die polyklonalen Antikörper nämlich nicht zur Verfügung. Die strukturellen Details über die hier vorgestellten Peptideptiope liefern im Gegensatz zu den kommerziellen Sequenzen, die unter Verschluss gehalten werden, nützliche Ansatzpunkte für die Weiterentwicklung von Antikörper-selektiven und hochsensitiven ELISA-Testsystemen.

3.5.3 Weitere Doppel-D-Peptide - Doppel-D-Scan

Das *hairpin*-Designelement der paarweise korrelierten D-Aminosäuren wurde zur Vervollständigung der Ergebnisse in alle weiteren möglichen Positionen (also w3/l12 in Peptid **15**, h2/v13 in **16** sowie c1/c14 in **17**) des ursprünglichen all-L-Epitops eingeführt. Es kann also sowohl als chemisch-synthetische Mutation in vorbestimmte Positionen eingebracht als auch, in Anlehnung an klassische Scan-Methoden (bspw. Ala-Scan), systematisch durch die H-Brücken- und nicht-H-Brücken-Positionen eines β -*hairpin*-Peptids geschoben werden (Abbildung 3.25).

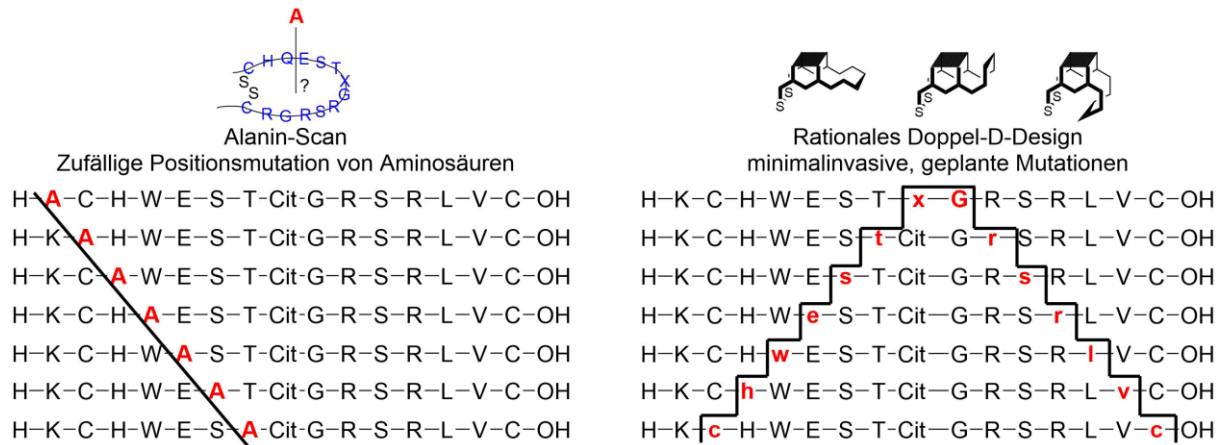


Abbildung 3.25. Das Doppel-D-Design im Vergleich zu Positionsscan-Methoden (hier Ala-Scan). Die paarweise korrelierte Einführung von Aminosäuren kann durch systematisches Anwenden auf eine β -hairpin-Peptid auch im Stile eines Scans angewendet werden.

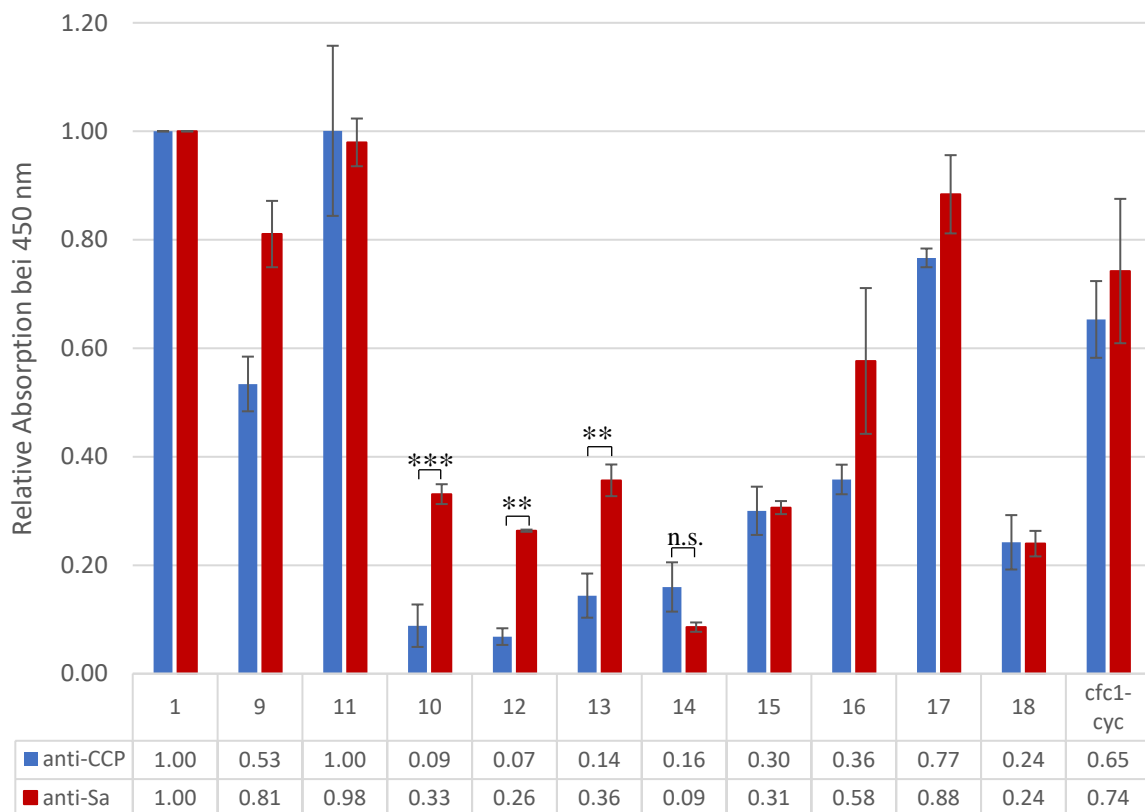


Abbildung 3.26. Balkendiagramm der ELISA-Test-Ergebnisse aller synthetisierten Mono-, Doppel-, Tetra- und all-D-Peptidepitope relativ zu Referenzpeptid **1**. Zusätzlich ist das literaturbekannte **cfc1-cyc** eingetragen. Folgende Definitionen wurden verwendet: $P > 0.5$ (n.s.: nicht signifikant), $P < 0.5$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***).

Diese Methode unterscheidet sich allerdings dadurch, dass es sich nicht um eine beliebig verwendbare Positionsmutation handelt, sondern der geplante, korrelierte Austausch von Aminosäurepaaren zur gezielten Beeinflussung der Sekundärstruktur im Vordergrund steht (vgl. Kapitel 1.9). Die zusätzlichen Peptidepitope **15**, **16** und **17** zeigten keine Vorzugskonformation in wässriger Lösung. Alle korrelierten D-Mutationen, die innerhalb des hydrophoben Clusters durchgeführt wurden, führen also zu einem Zusammenbruch der *hairpin*-Faltung. Epitop **17** (c1,c14) beweist die Wichtigkeit der Position der Disulfidbrücke, die nur auf der Seite des W3/L12-Kontaktpaars für eine stabile Konformation sorgt, wenn sie als einzelnes Disulfid eingebracht wird (vgl. Kapitel 3.6). Es wurden unterschiedlich hohe Affinitäten in Bezug auf den anti-CCP- und den anti-Sa-Antikörper, ohne diese beiden anhand der Absorptionen deutlich voneinander unterscheiden zu können (Abbildung 3.26). Je weiter sich die Doppel-Mutation vom Cit-enthaltenden *turn* entfernt befindet, desto weniger wird die Antikörperbindung (im Fall der flexiblen Peptide in einem *conformational selection*-ähnlichen Modus) beeinflusst und die Affinität steigt.

3.5.4 Ein all-D-Peptidepitop

Neben den bereits beschriebenen gemischten L/D-Peptiden wurde das all-L-Referenzepitop **1** auch in seiner enantiomeren Form als all-D-Variante **18** dargestellt. Im ELISA-Test sowohl gegen den anti-CCP- als auch den anti-Sa-Antikörper zeigt dieser β -*hairpin*, dass die Affinität nicht vollständig verloren geht, sondern etwa ein Viertel der Aktivität von **1** erreicht (siehe Abbildung 3.26). Dies ist in Anbetracht der hohen Spezifität der Epitop-Paratop-Wechselwirkungen bemerkenswert. Hier stellt sich dementsprechend die Frage, in welcher Form das Peptidantigen im Bindungsgleichgewicht erkannt wird. Da es sich um das Spiegelbild eines formstabilen Epitops handelt, ändert sich zwar die Verdrillung (der *twist*) des β -*hairpins* (hier also linksgängig), die chemische Funktionalität und die Ladungsverteilung bleiben aber erhalten (vgl. Abbildung 3.27). Aufgrund der ihm eigenen Symmetrie bleibt somit eine Restaktivität erhalten, wobei der Antikörper nichtsdestotrotz deutlich zwischen den beiden Enantiomeren unterscheidet.

In der Literatur finden sich einige Beispiele, bei denen die biologische Aktivität der all-D-Epitope im Vergleich zu ihren all-L-Vorläufern erhalten bleibt oder zumindest nicht verloren geht.^[293–296] Gleichzeitig besitzen diese Derivate eine deutlich erhöhte Protease-Stabilität. Anwendungen finden sich im sogenannten *mirror-image*-Phagendisplay, bei dem all-L-Peptidbibliotheken gegenüber einem D-Enantiomer des Zielproteins präsentiert werden.^[297–300] Die vielversprechendsten Peptide werden anschließend ausgewählt, um in ihrer all-D-Form

synthetisiert zu werden, wobei ihre biologische Aktivität gegenüber dem L-enantiomeren Zielprotein zusammen mit den wünschenswerten Eigenschaften des all-D-Epitops erhalten bleiben. In Zusammenhang dieser Arbeit besonders interessant sind Anwendungen in der Affinitätschromatographie polyklonaler Antikörper, wie es die RA-Autoantikörper sind. Dabei werden die all-D-Peptide auf einer geeigneten Matrix immobilisiert und so eine entsprechende Affinitätschromatographiesäule gepackt, über die anschließend Blutseren eluiert werden.^[301] Die D-Peptide sind dabei stabil gegenüber im Serum enthaltenen Enzymen wie Trypsin oder Chymotrypsin und binden enthaltene Immunglobuline.

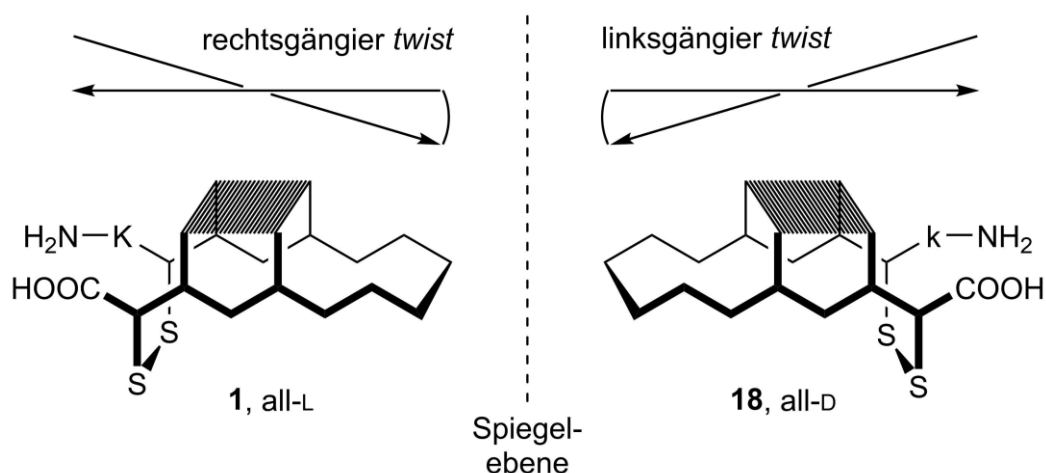


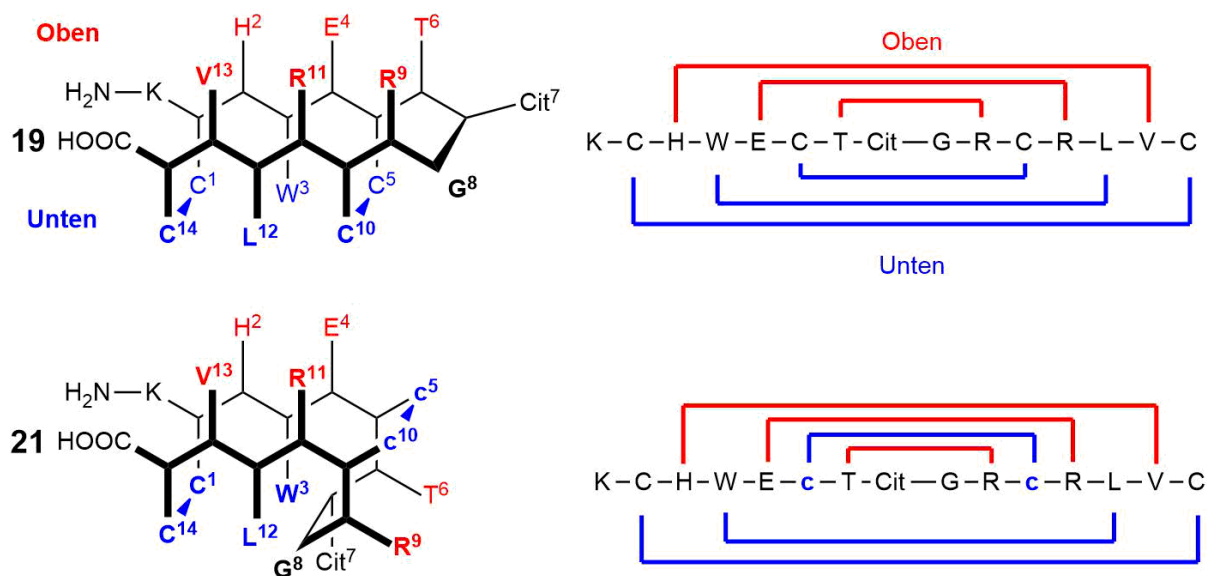
Abbildung 3.27. Schematische Darstellung von Bild (1, all-L) und Spiegelbild (18, all-D). Die Ergebnisse der ELISA-Tests sind in Abbildung 3.26 einzusehen.

3.6 Modulkombination: D-Aminosäuren und Disulfide

In Kapitel 3.5 wurde das modulare Syntheseprinzip für die Einführung korrelierter Aminosäurepaare in *hairpin*-Peptide am Beispiel von D-Aminosäuren erklärt.^[289] In diesen Peptiden ist ein einzelnes, terminales Disulfid enthalten, das essentiell für die Ausbildung der Vorzugskonformation in Lösung ist. FISCHER *et al.* kombinierten das biologisch aktive Filaggrin-Peptid **cfc1-cyc** mit dem COCHRAN-Motiv und einem zusätzlichen Disulfid.^[302] Als aus der Natur stammendes Vorbild diente dabei das antimikrobiell wirksame Tachyplesin, ein polykationisches Peptid mit zwei Disulfiden.^[26,303] Das entstandene Bidisulfid-*hairpin*-Peptid wurde als privilegierte Struktur (*privileged structure*) mit RA-Epitop-Eigenschaften als auch leicht antibiotischer Wirkung beschrieben. Im Folgenden wurden die beiden genannten Design-Elemente, also die Doppel-D-Mutation und das Bidisulfid, zusammengeführt, um die Anwendbarkeit sowie Kombinierbarkeit der verschiedenen Module zu überprüfen und zu

erweitern. Insgesamt stellt die Kombination gerade dieser Module eine große Herausforderung dar, da D-Aminosäuren Peptidkonformationen destabilisieren können, während eine Vielzahl von Thiolen eine große Herausforderung an die Regioselektivität der korrekten Disulfidverknüpfung stellt.

Durch die Zickzack-ähnliche Struktur des *hairpins*, wie sie bisher in schematischen Darstellungen verwendet wurde und im Detail in Abbildung 3.28 einzusehen ist, entstehen eine Ober- und eine Unterseite relativ zum Peptid-*backbone* (siehe auch Einleitung 1.2). Die D-Aminosäuren sorgen für einen nahezu rechtwinkligen Knick in der Konformation, sodass auch die Orientierung der Aminosäureseitenketten in Bezug auf die Ober- und Unterseite der *hairpin*-Ebene beeinflusst wird.



Peptid	Sequenz	Peptid	Sequenz
19	KCHWE ^S CTCitGRCRLV ^S C	20	KcHWE ^S CTCitGRCRLV ^S c
21	KCHWE ^S cTCitGRcRLV ^S C	22	KcHWE ^S cTCitGRcRLV ^S c

Abbildung 3.28. Die vereinfachte Zickzack-Darstellung eines β -*hairpins* verdeutlicht die relative Ausrichtung der Seitenketten (oben rot und unten blau) beim all-L-Bidisulfid **19**. Ein Paar von D-Aminosäuren dreht die Seitenketten auf die entsprechend gegenüberliegende Seite, wie für Peptid **21** gezeigt. Die Tabelle listet die synthetisierten Bidisulfid-Peptide **19** bis **22** als Zickzackstruktur ohne die Seitenketten auf.

Verwendet man Disulfide (als gegenüberliegende Paare auf dem antiparallelen β -sheet) in L- und D-Konfigurationen lassen sich diese unterschiedlichen Seitenkettenmuster und der zugehörige konformationelle Raum im Vergleich zu den Doppel-D-Monodisulfiden noch weiter verfestigen. Die aus diesem Design resultierenden, synthetisierten Bidisulfid-Epitope **19** (C1-C14, C5-C10), **20** (c1-c14, C5-C10), **21** (C1-C14, c5-c10) und **22** (c1-c14, c5-c10) sind mit vollständiger Sequenz und Piktogramm ebenfalls in Abbildung 3.28 dargestellt. Die Disulfide befinden sich jeweils in nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Positionen, da sie dort am stärksten stabilisierend wirken.^[28] Das Aminosäurepaar W3/L12 nimmt zwar ebenfalls eine nicht-H-Brücken-Position ein, ist aber zentraler Bestandteil des *hairpin*-stabilisierenden hydrophoben Clusters und liefert in NMR-Spektren wichtige Aussagen über die Beschaffenheit der Konformation. Dieser Sequenzabschnitt wurde dementsprechend unverändert belassen.

Die regioselektive Oxidation von Cystein-reichen Peptiden stellt deshalb eine synthetische Herausforderung dar, da eine Vielzahl intra- als auch intermolekularer Kombinationsmöglichkeiten zur Verfügung steht. Ohne orthogonale Cystein-Schutzgruppen ist sie häufig schwierig zu erreichen, und selbst diese sind kein Garant für ein einheitliches Produkt. Der Verlauf der Oxidation von Tetra-D-Bidisulfid **22** wurde beispielhaft mittels analytischer HPLC verfolgt und steht repräsentativ für alle anderen D-Bidisulfid-Peptide (die Chromatogramme sind in Abbildung 3.29 einzusehen). Tatsächlich konnten im Verlauf der Luftoxidation in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer ($c_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mg/mL}$, $\text{pH} = 8.4$) nur zwei Hauptpeaks identifiziert werden, wobei nach etwa einem Tag ausschließlich das vollständig oxidierte Bidisulfid erhalten wurde. Das erste Oxidationsprodukt ($t_R = 5.99 \text{ min}$), also eines der beiden möglichen Monodisulfide, wandelt sich abschließend in das zweifache Disulfid ($t_R = 5.47 \text{ min}$) um. Die oxidative Faltung wird dabei durch die Vorzugskonformation und im Speziellen durch die Ausbildung des hydrophoben Clusters gesteuert. Sie lässt sich durch das *framework*-Modell beschreiben (Abbildung 3.30).^[304] Stellt man sich den oxidativen Faltungsprozess als Trichter vor, dessen Breite die Entropie und dessen Länge die Energie darstellt, so entstehen entlang der Trichterachse nach unten hin energetisch bevorzugte Peptidkonformationen. Für die hier genannten Epitope wird eine definierte Anzahl an Intermediaten beobachtet, nämlich die Monodisulfide, weshalb ihr Faltungsprozess ein Paradebeispiel für das *framework*-Modell sind. Durch die Präorganisation der Peptide ist deren Beweglichkeit und damit die Anzahl an Konformationen begrenzt. Das konkurrierende *collapse*-Modell beschreibt im ersten Schritt eine Vielzahl von unspezifischen Disulfidbildungen (*packing*), die sich im zweiten Schritt zum nativen Peptid umstrukturieren (*reshuffling* der Disulfide führt zur sogenannten *consolidation*), was hier nicht festgestellt werden konnte (ein Beispiel dafür findet sich im Kapitel 3.8 wieder).

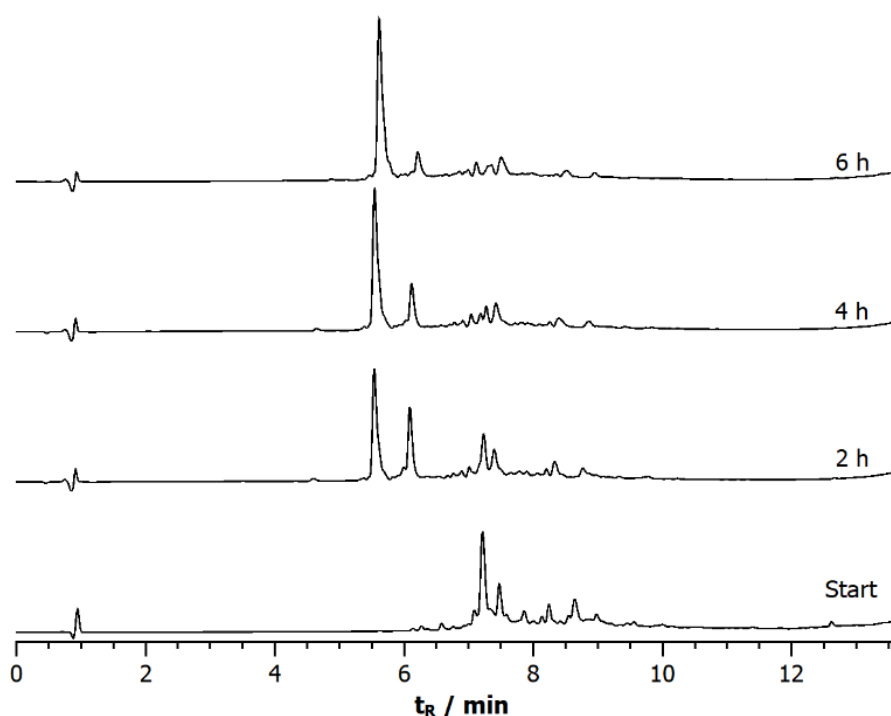


Abbildung 3.29. HPLC-Chromatogramme der Oxidation von Tetra-D-Bidisulfid **22** (in Ammoniumcarbonat-Puffer, pH = 8.4, $c_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mg/mL}$) zum am rechten Rand angegebenen Zeitpunkt. Der Verlauf ist beispielhaft für alle weiteren 14er-Bidisulfid-*hairpins*.

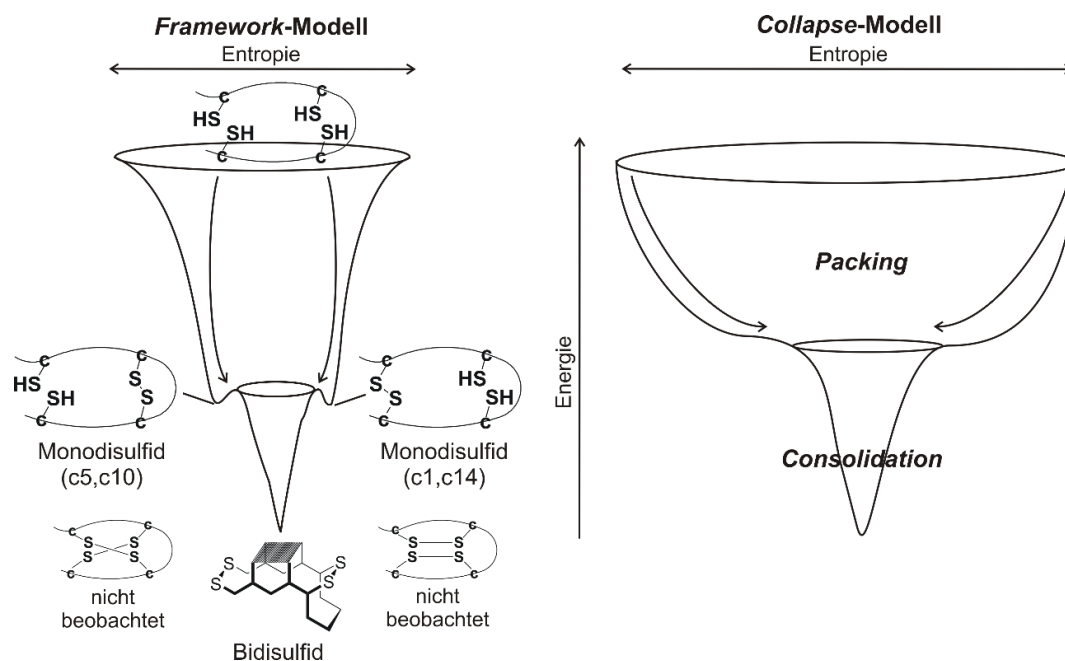


Abbildung 3.30. Peptid **22** mit vier ungeschützten D-Cysteinen faltet in eine β -*hairpin*-Konformation mit einem terminalen und einem zentralen Bidisulfid. Die oxidative Faltung dieser Spezies verläuft über das *framework*-Modell (links) mit einer limitierten Anzahl von Zwischenstufen ab. Das *collapse*-Modell (rechts) beschreibt dagegen die Ausbildung einer Vielzahl von unspezifischen Disulfidbindungen, die sich erst anschließend zum korrekten Faltungsprodukt umstrukturieren.

Für die Tetrathiolsequenz **20** (c1/c14,C5/C10) konnte das erste Oxidationsprodukt in ausreichenden Mengen isoliert werden, um es NMR-spektroskopisch zu untersuchen. Nach vollständiger Zuordnung des Monodisulfids anhand der ^1H -NMR-, TOCSY- und NOESY-Spektren konnte festgestellt werden, dass sich das zentrale L-Disulfid in Position 5 und 10 als erstes schließt. Das HSQC in Abbildung 3.31 liefert die notwendigen experimentellen Daten für das entsprechende Monodisulfid **20md** (c1/c14, C5-C10): Während die β -Kohlenstoffe von c1 und c14 eine chemische Verschiebung von etwa 25 ppm besitzen, sind die β -Kohlenstoffe von C5 und C10 ins Tieffeld auf über 40 ppm verschoben. Die roten Signale heben den Unterschied zwischen einer reduzierten, geringen Signaldispersion und einer hohen Dispersion im oxidierten Zustand der zugehörigen β -Protonen hervor.

Im Fall von Peptid **22** (c1-c14, c5-c10) wurde die zuerst geschlossene Disulfidbindung durch Abfangen der nicht reagierten Thiole des Monodisulfids mit Chloracetamid, anschließendem tryptischen Verdau und LC-MS-Analyse charakterisiert. Wie für Bidisulfid **20** entsteht zuerst das zentrale Disulfid (Details finden sich im Anhang 8.3).

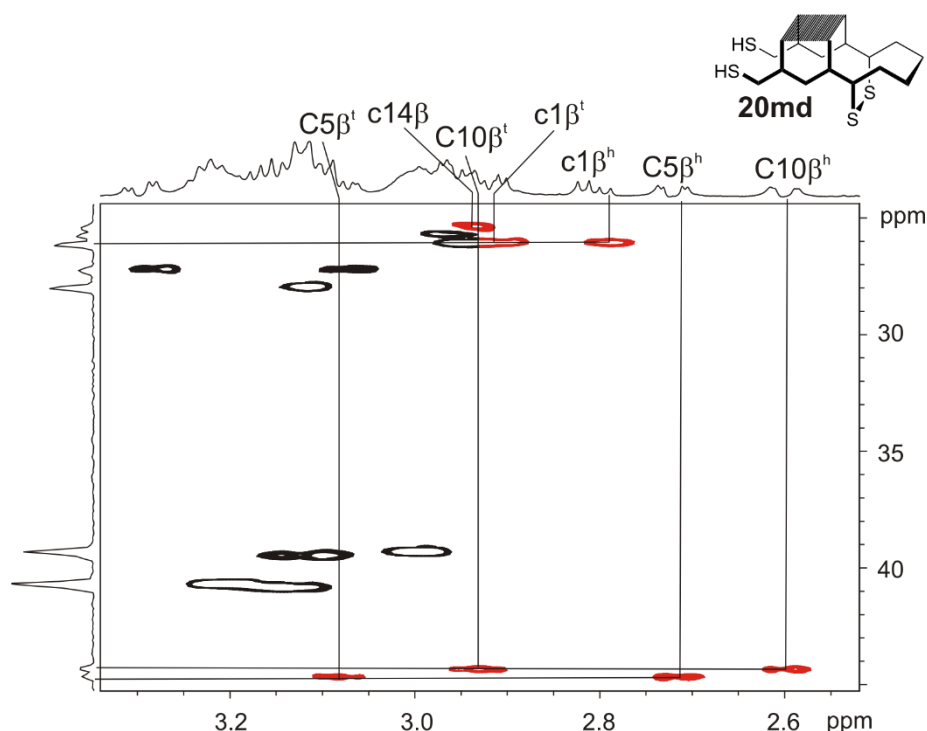


Abbildung 3.31. Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D₂O 9:1) des Monodisulfid-Peptids **20md** (c1/c14,C5-C10). Die $^1J_{\text{C,H}}$ -Korrelationen zwischen den β -Kohlenstoffen aller Cysteine und deren zugehörigen Protonen sind hervorgehoben. Sie bestätigen einen reduzierten Zustand von c1 und c14 (~25 ppm, geringe ^1H -Signaldispersion) und eine Disulfidbrücke zwischen C5 and C10 (über 40 ppm, hohe ^1H Signaldispersion). ^h: Hochfeld, ^t:Tieffeld.

3.6.1 Konformationsanalyse der Bidisulfid-Epitope

Die Bidisulfid-Epitope **19-22** konnten über semipräparative HPLC in hoher Reinheit erhalten werden und wurden anschließend mittels CD- und NMR-Spektroskopie näher untersucht. Die entsprechenden CD-Spektren sind in Abbildung 3.32 im Vergleich zum all-L-Referenzepitop **1** (C1-C14, S5/S10) einzusehen. Sie zeigen einen gut vergleichbaren Satz an globalen Konformationen. Die geringsten Änderungen gegenüber der all-L-*hairpin* **1** mit einem Elliptizitäts-Minimum bei 216 nm und einem schwachen Maximum bei 233 nm ergeben sich unerwarteterweise für das Bidisulfid-Peptid **20** (c1-c14, C5-C10), wobei die Intensitäten nahezu identisch bleiben und nur das Minimum eine geringe hypsochrome Verschiebung auf 213 nm erfährt. Das all-L-Bidisulfid **19** (C1-C14,C5-C10), das dem Epitop **1** am ähnlichsten sein sollte, zeigt dagegen ein deutlich intensiveres Maximum bei 231 nm sowie ein sehr breites Minimum bei 211 nm. Das CD-Spektrum von Doppel-D-Bidisulfid **21** (C1-C14,c5-c10) weist insgesamt einen ähnlichen Verlauf wie **19** auf, wobei das Maximum eine Blauverschiebung zu 226 nm aufweist. Das korrelierte Minimum liegt bei vergleichbaren 210 nm. Die Daten von Tetra-D-Peptid **22** (c1-c14, c5-c10) ergeben ein zuvor nicht beobachtetes Minimum bei 235 nm, das in ein schwaches Maximum bei 226 nm übergeht. Das zweite Minimum bei 212 nm fällt etwas weniger intensiv als bei den anderen Bidisulfiden aus.

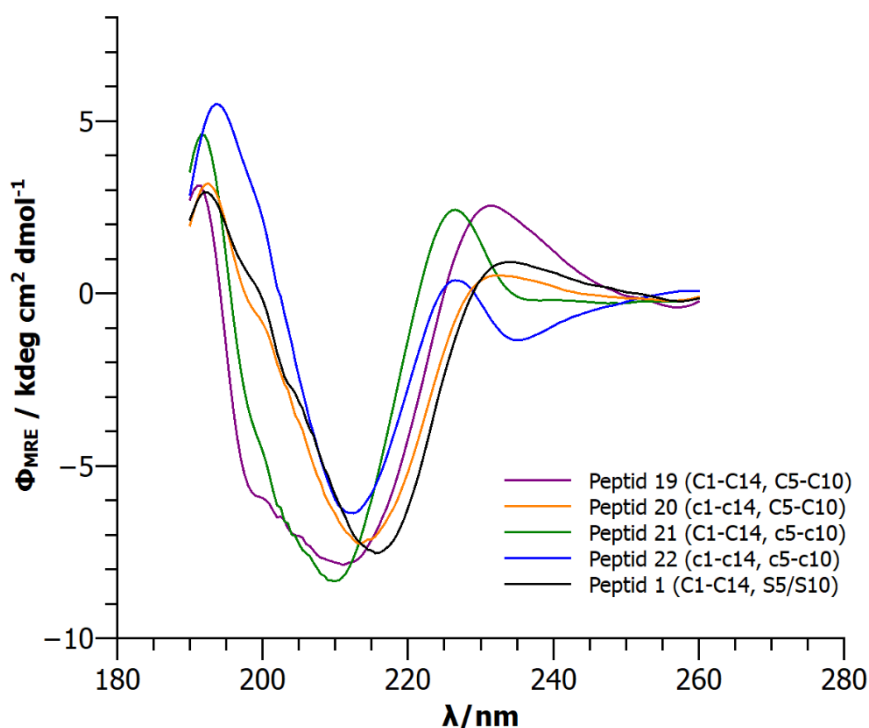


Abbildung 3.32. CD-Spektren der Bidisulfid Peptide **19-22** sowie Referenzepitop **1** im Vergleich (200 μM in wässriger Lösung).^[289]

Somit zeigte jedes der Bidisulfid-Peptide sein eigenes, charakteristisches CD-Spektrum, wobei sich kein einfacher Zusammenhang zwischen der Position der D-Disulfide und den beobachteten Maxima und Minima herstellen lässt. Die Unterschiede in den langwelligeren Bereichen der Spektren lassen sich durch die verschiedenen Beiträge der Tryptophan-Seitenkette erklären, die sich je nach relativer Anordnung der unterschiedlich konfigurierten Disulfide in unterschiedlichen Umgebungen befindet. Eine detailliertere Untersuchung der konformationellen Eigenschaften wurde im Folgenden mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt.

Alle Bidisulfid-Peptide zeigen in ihren ^1H -NMR-Spektren eine hohe Signaldispersion im amidischen Bereich an und belegen damit die Ausbildung einer Vorzugskonformation in wässriger Lösung (Abbildung 3.33). An dieser Stelle bietet sich außerdem ein Vergleich mit Monodisulfid **17** (c1-c14,S5/S10) an (siehe Kapitel 3.5.3): Das Doppel-D-Cystein in den terminalen Positionen ist alleine nicht ausreichend, um die globale *hairpin*-Faltung aufrecht zu erhalten. Ein zweites Disulfid, egal ob D- oder L-konfiguriert, sorgt für eine Stabilisierung der Konformation (Epitope **20** und **22**) und ermöglicht eine detaillierte Analyse.

Die Cysteine zeigen bei gleicher Konfiguration auch gleiche Verschiebungen. Die korrelierte D-Mutation c1,c14 in den Peptiden beeinflusst durch die terminale Positionierung vor allem den hydrophoben Cluster, während c5 und c10 einen Knick im *backbone* verursachen und sich durch die zentrale Stellung im β -*hairpin* sowohl auf die *turn*-Region als auch den hydrophoben Cluster auswirken. Tatsächlich zeigen die zentralen D-Cysteine einen insgesamt deutlich stärkeren Einfluss auf die globale Struktur als die terminalen. So ähneln sich die Verschiebungswerte der Spezies **21** und **22**, die c5 und c10 beinhalten, stärker als diejenigen, in denen c1 und c14 eingebaut wurde (**20** und **22**). Umgekehrt zeigt sich diese Ähnlichkeit bei den L-Mutanten **19** und **20** mit C5 und C10, während die Epitope **19** und **21** mit C1 und C14 unterschiedliche Verschiebungsmuster aufweisen. All-L-Bidisulfid **19** (C1-C14,C5-C10) und dementsprechend auch Doppel-D-Bidisulfid **20** (c1-c14,C5-C10) zeigen große Übereinstimmung zum Referenzpeptid **1** (C1-C14, S5/S10). Die Tieffeldverschiebung des Cit7-NHs (~9.6 ppm) und E4-NHs (~9.4 ppm), die ein untrügliches Zeichen für die Intaktheit des hydrophoben Clusters und einer ähnlichen Orientierung des Haptens Citrullins ist, bleibt erhalten. Unterschiede für Doppel-D-Epitop **20** ergeben sich vor allem für das mutierte D-Cystein 14 selbst (c1-NH-Signal nicht vorhanden) als auch im Besonderen für das H2-NH, die beide eine deutliche Hochfeldverschiebung im Vergleich zu **19** erfahren (W3, L12 und V13 mit leichter Hochfeldverschiebung). Die Bidisulfid-Epitope **21** (C1-C14,c5-c10) und **22** (c1-c14,c5-c10) zeigen in den ^1H -NMR-Spektren eine sehr starke Hochfeldverschiebung der

amidischen Protonensignale des H-Brücken-gebundenen *cross-strand*-Paares E4/R11 (E4: ~8.6 ppm in **21** und ~8.8 ppm in **22**; R11: ~8.2 ppm in beiden Fällen). Dieses befindet sich genau vor dem durch den von c5-c10 verursachten *backbone*-Knick. Dafür weist nun das T6-NH eine starke Tieffeldverschiebung auf, sodass es im Vergleich zu den Epitopen **19** und **20** den Verschiebungswert mit dem E4-NH getauscht zu haben scheint. Cit7 zeigt für die Epitope **21** und **22** einen ausgeprägten Hochfeld-Shift von etwa einem ppm zu 8.6 ppm. Die Haptenausrichtung sollte für diese beiden Spezies also gleich sein. Auffällig bei Doppel-D-Bidisulfid **21** (C1-C14,c5-c10) ist außerdem die stärkste Tieffeldverschiebung des H2-NHs und des W3-NHs, wohingegen diese ppm-Werte für Tetra-D-Bidisulfid **22** (c1-c14,c5-c10) eher denjenigen von Bidisulfid **20** (c1-c14, C5-C10) entsprechen. Das G8-NH-Signal ist für alle Spezies vermutlich deshalb vorhanden, weil das zentrale Disulfid in Position 5 und 10 die konformationelle Beweglichkeit des gesamten *turns* einschränkt und damit den *turnflip* verlangsamt.

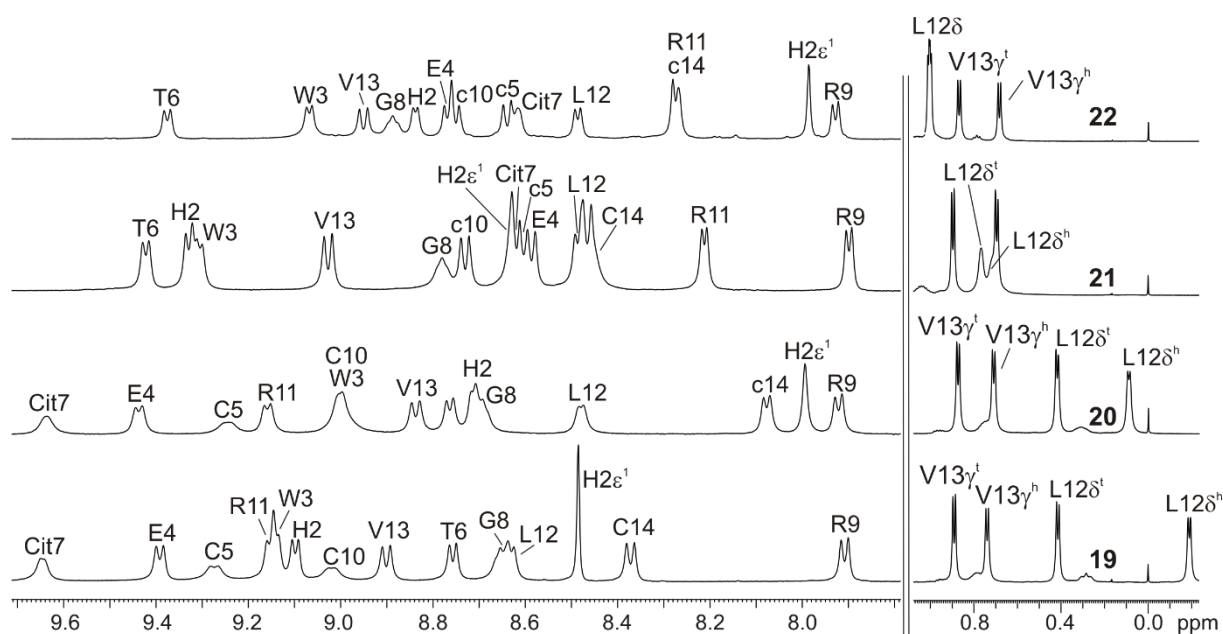


Abbildung 3.33. Ausschnitte (NH- und Leu-Bereich) aus dem ^1H -NMR der Bidisulfid-Peptide **19** (C1-C14,C5-C10), **20** (c1-c14,C5-C10), **21** (C1-C14,c5-c10) und **22** (c1-c14,c5-c10) mit unterschiedlich konfigurierten Disulfidpaaren (600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Die Leu-H δ -Muster unterscheiden sich unter allen Bidisulfiden, was die jeweilige veränderte chemische Umgebung des Kontaktpaars W3/L12 erklärt. Je nachdem, auf welcher Seite der *backbone*-Ebene sich die Disulfidpaare befinden, ist das Paar von keinem (**22**), zwei (**20** und **21**) oder vier (**19**) Schwefeln umgeben. Auch hier bestätigt sich ein stärkerer Einfluss des c5-

c10-Disulfids: Während der räumliche Umbau des terminalen Disulfids auf die Oberseite in Peptid **20** in einer zwar verringerten, aber dennoch deutlich vorhandenen L12-Hδ-Signaldispersion/-Hochfeldverschiebung resultiert, geht diese Eigenschaft für die Varianten mit einem zentralen D-Disulfid fast (**21**) oder ganz (**22**) verloren. Die chemische Umgebung des Leucins und damit auch des Tryptophans ändert sich durch die Doppel-D-Cys-Mutation also deutlich.

Die Temperaturgradienten der besprochenen Bidisulfide finden sich in Abbildung 3.34 wieder. Alle Spezies zeigen vergleichbare $\Delta\delta/\Delta T$ -Werte für die relevanten β -sheet-Aminosäuren und weisen zusätzlich durch abwechselnd große und kleine Gradienten auf das Vorhandensein der β -hairpin-Konformation hin. In Kombination mit den zuvor besprochenen Verschiebungsdetails kann daraus geschlossen werden, dass global gesehen alle Spezies eine β -hairpin- oder β -hairpin-ähnliche Konformation einnehmen. Lokale Besonderheiten, die durch die unterschiedliche Kombination an Disulfid-Konfigurationen zustande kommen und konformativ fixiert werden, sorgen für ein insgesamt unterschiedliches *backbone* sowie veränderte *turn*-Strukturen und erschließen dabei neuen konformationellen Raum. Schließlich beweist die Methodik die Kombinierbarkeit der synthetischen Module und die dynamische Anpassungsfähigkeit und die damit einhergehende Robustheit des β -hairpin-Motivs gegenüber derartigen Mutationen.

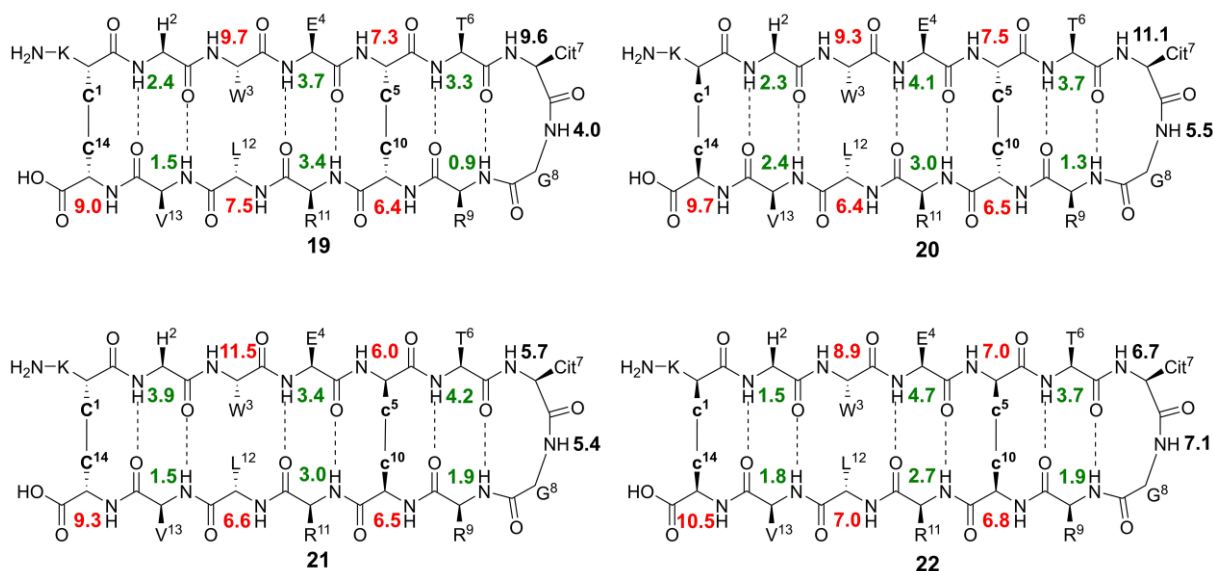


Abbildung 3.34. Temperaturgradienten der Bidisulfid-Epitope **19** bis **22** in ppb/K.

Alle spektroskopischen Details, Daten aus 2D-NMR-Spektren sowie 3J -Kopplungskonstanten und daraus erhaltene χ_1 -Winkel, flossen in eine NMR-basierter Strukturdarstellung der

ungewöhnlichen Konformationen von **21** (C1-C14,c5-c10) und **22** (c1-c14,c5-c10) ein. Beide enthalten ein zentrales D-Disulfid. Der dadurch entstehende Knick in den Positionen 5 und 10 ist in Abbildung 3.35 sehr gut erkennbar. Die *backbones* der Peptide erhalten dadurch eine annähernd L-förmige Geometrie, wobei sich der *turn* um das zentral stabilisierende W3/L12-Paar biegt (die L-Aminosäuren T6/R9 bewirken im Anschluss an das D-Aminosäurepaar einen erneuten Knick in die entgegengesetzte Richtung). Die Harnstoff-Seitenkette des L-Citrullin wirkt wie eine Art verlängerter Arm des Peptidrückgrats. Durch die ungewöhnliche Anordnung der D-Aminosäurepaare befinden sich in Bidisulfid **21** vier Aminosäureseitenketten-Paare auf einer Seite, in Peptid **22** sogar fünf (c1-c14, H2/V13, E4/R11, c5-c10, T6/R9). Alle analytischen Daten weisen auf das Vorliegen einer *hairpin*-Struktur hin, die aber in diesen beiden Fällen stark von einer klassischen β -*hairpin*-Struktur, wie sie in Proteinen gefunden wird, abweicht.

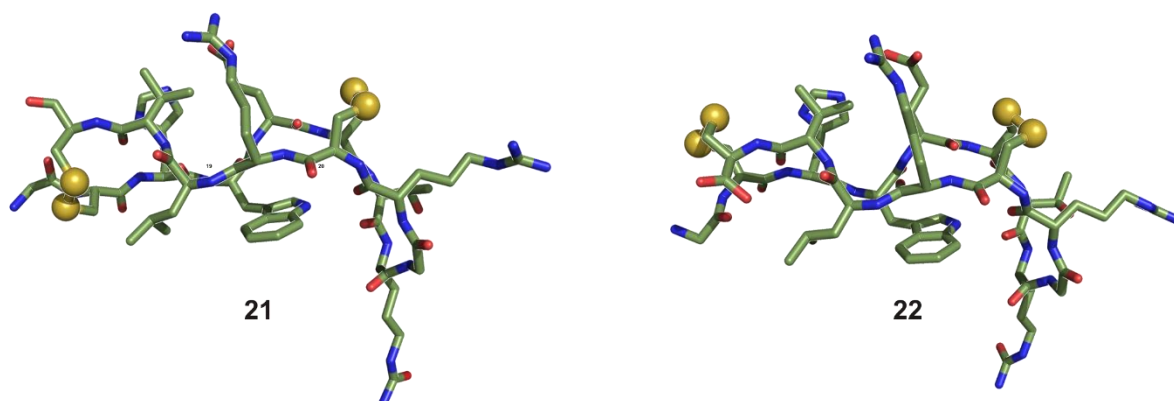


Abbildung 3.35. NMR-basierte Computermodelle der Bidisulfidpeptide **21** (C1-C14,c5-c10) und **22** (c1-c14,c5-c10).

3.6.2 ELISA-Tests der Bidisulfide

Die Bidisulfid-Peptide **19-22** weisen neben rigiden, ungewöhnlichen *hairpin*-Konformationen durch das zweite Disulfid auch eine veränderte chemische Funktionalität auf. Im vorhergehenden Kapitel wurde aufgezeigt, dass die Sekundärstruktur trotz des *O/S*-Austauschs erhalten bleibt. Ob die biologische Aktivität gegenüber RA-Autoantikörpern mit der von Referenzpeptid **1** vergleichbar ist, wurde in ELISA-Tests untersucht. Abbildung 3.36 enthält die Balkendiagramme der Tests gegen anti-CCP- und anti-Sa-Antikörpern. Die Bidisulfid-Epitope weisen allesamt eine stark verringerte bis gar keine Affinität mehr auf. Allein der Wechsel von Ser5/Ser10 zum Disulfid in Peptid **19** verringert die gemessene Absorption um zwei Drittel im Vergleich zum besten Binder **1**. Gleiches gilt für Epitop **20** (c1-c14,C5-C10), was für einen geringen Einfluss des terminalen Disulfids spricht. Durch das zweite Disulfid

verändert sich die chemische Funktionalität, Freiheitsgrade und Dynamik des Systems werden verringert. Der Erkennungsprozess durch den Antikörper ist auch bei formstabilen Peptidepitopen nur in erster Näherung durch das Schlüssel-Schloss-Prinzip beschreibbar. Eine konformationelle Anpassung an die Proteinoberfläche, die eine gewisse Flexibilität verlangt, findet in jedem Fall statt.

Die Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass das zentrale Disulfid in Position 5 und 10 den entscheidenden Einfluss hat: Werden D-Cysteine eingebaut (Peptide **21** und **22**), verliert das Epitop seine Affinität sogar vollständig. Die Konformation dieser beiden Peptide hat sich durch den zusätzlichen Knick und die räumliche Einschränkung durch das D-Disulfid so stark verändert, dass eine Erkennung durch die Antikörper nicht mehr möglich ist.

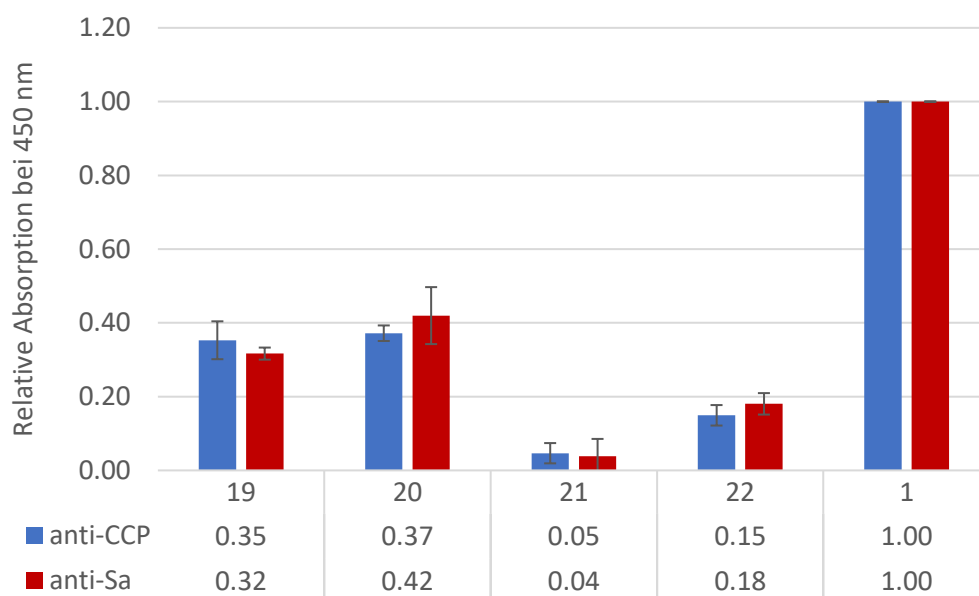


Abbildung 3.36. ELISA-Ergebnisse der unterschiedlich konfigurierten Bidisulfide **19** bis **22** relativ zu Referenzpeptid **1** in Form eines Balkendiagramms.

3.7 Epitopgröße und *hairpin*-Periodizität

Das verwendete Peptidepitop **1** umfasst 15 Aminosäuren, wobei der zentrale β -*hairpin* aus 14 Aminosäuren besteht und ein Lysin N-terminal für die Anbindung an die Mikrotiterplatte hinzugefügt wurde (Kapitel 3.4). Es entspricht damit der experimentell ermittelten Periodizität von β -*hairpins*: Während geeignete Sequenzen aus $4n+2$ Aminosäuren ($n = 1,2,3,\dots$) stabile *hairpin*-Faltungen erlauben, führen Sequenzen aus $4n$ Aminosäuren unter ansonsten gleichen Bedingungen normalerweise zu *random coil*-Strukturen.^[305] Dieses Verhalten spiegelt sich im

Muster der Wasserstoffbrücken-gebundenen und nicht-Wasserstoffbrücken-gebundenen Aminosäurepaare wider (Abbildung 3.37). Ein cyclisches Hexapeptid kann dabei als Modell für zwei miteinander verbundene *turns* angesehen werden. Ausgehend davon muss jeweils ein Paar nicht-H-gebundene und ein Paar H-gebundene Aminosäuren hinzugefügt werden, um einen stabilen 10er-, 14er-, 18er-(etc.)- β -hairpin mit n nicht-H-gebundenen und $n+1$ H-gebundenen Paaren zu synthetisieren.

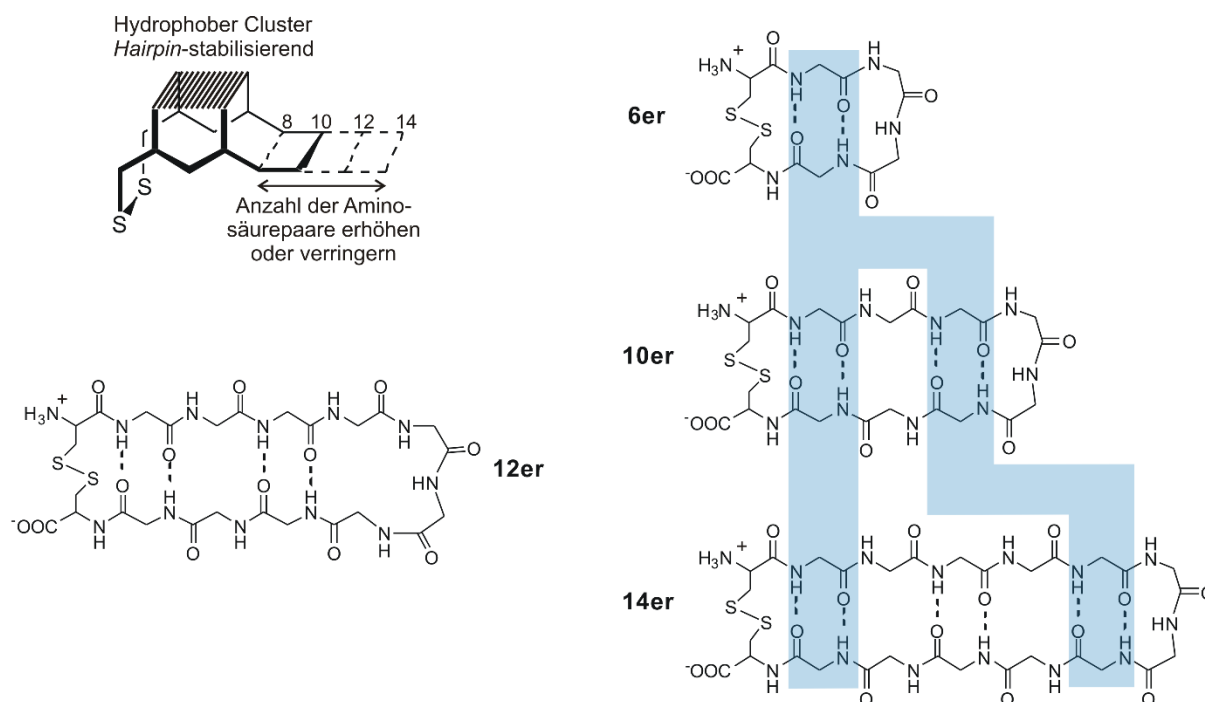
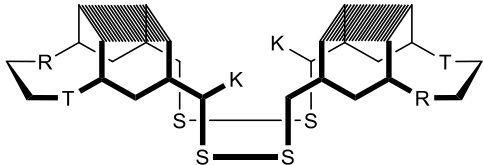
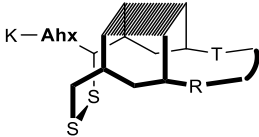
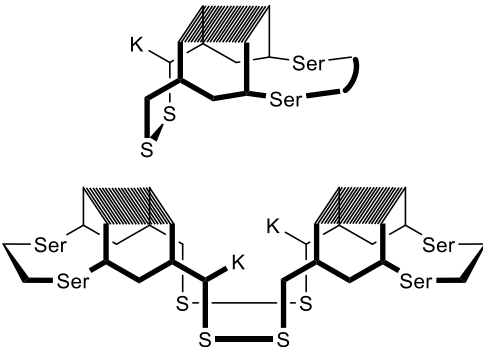
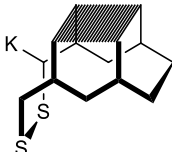
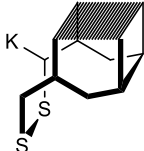


Abbildung 3.37. Schematische Übersicht über die Periodizität und H-Brücken-Muster von β -hairpin-Peptiden.^[177] Dabei hält der hydrophobe Cluster die terminalen Enden konstant, während Paare von Aminosäuren hinzugefügt oder entfernt werden können (oben links). Während cyclische 6er-, 10er- und 14er-Peptidsequenzen (rechte Spalte) stabile *hairpins* hervorbringen, weichen 12er-Peptide (unten links) von dieser Periodizität ab und sind dafür bekannt, *random coil*-Strukturen zu erzeugen.^[305]

Daraus ergab sich die Frage, ob eine Verkürzung des Epitops, einerseits in Bezug auf eine stabile Faltung, andererseits in Bezug auf die biologische Aktivität gegenüber RA-Autoantikörpern, zu formstabilen und affinen Antigenen führt. Damit wurde außerdem überprüft, ob die Ringgröße des Bidisulfids oder der hydrophobe Cluster einen größeren Einfluss auf die *hairpin*-Ausbildung hat. In Anlehnung an das korrelierte Design wurden dementsprechend jeweils gegenüberliegende Aminosäurepaare entfernt, der hydrophobe Cluster aber intakt belassen (Abbildung 3.37, oben links).

Tabelle 3.4. Aminosäuresequenzen und schematische Darstellung der paarweisen Verkürzung des Epitops, ausgehend von Referenzpeptid **1**.

Peptid	Aminosäuresequenz	Piktogramm
23	$K^0C^1HWET^5CitGR^8RLVC$	
23-Ahx	$KAhx^0C^1HWET^5CitGR^8RLVC$	
24	$K^0C^1HWES^5CitGS^8RLVC$	
25	$K^0C^1HWECit^5GRLVC^{10}$	
26	$K^0C^1HWERLVC^8$	

Auf diese Weise entstanden ausgehend vom 14er-Referenzpeptid **1** zunächst zwei 12er-Peptide (wobei jeweils das Aminosäurepaar S5/S10 in **23** bzw. T6/R9 in **24** entfernt wurde) sowie ein 10er-Peptid **25** und ein 8er-Peptid **26**, das ausschließlich aus dem hydrophoben Cluster CHWE/RLVC bestand. Die Sequenzen dieser Peptide sowie die entsprechenden Piktogramme finden sich in Tabelle 3.4 wieder. Bei der Oxidation der 12er-Peptide stellte sich zu überraschenderweise heraus, dass sich je nach Aminosäuresequenz Monomere und Dimere ausbildeten, was über die exakte Masse sowie Ladungs- und Isotopenmuster massenspektrometrisch nachgewiesen wurde. Für Peptid **24** konnten dabei sowohl Monomer

als auch Dimer isoliert werden, während für Peptid **23** nur das Dimer erhalten wurde. Eine zusätzliche, N-terminale 6-Aminohexansäure (Ahx) sollte eine mögliche Dimerisierung durch dessen sterischen Anspruch verhindern und führte ausschließlich zum gewünschten Monomer der 12er-Sequenz **23-Ahx**. Somit konnte durch eine terminale Modifikation, die die Citrullinumgebung unangetastet belässt, eine Veränderung des Monomer-/Dimerverhältnisses erreicht werden. Im Folgenden werden die **m**onomeren Spezies mit **m** und die **d**imeren Epitope mit **d** versehen.

Die NMR-Spektren aller Peptidepitope (einzusehen im experimentellen Teil) zeigen eine Vorzugskonformation in wässriger Lösung an. Der hydrophobe Cluster scheint der *hairpin*-Struktur also unabhängig vom Wasserstoffbrückenbindungsmuster eine so hohe Stabilität zu verleihen, dass eine Faltung erreicht wird. Die 10er-Variante **25** und das Referenz-14er-Epitop **1** entsprechen der Periodizität eines stabilen β -*hairpins*, was anhand der analytischen Daten nachvollzogen werden kann. Charakteristika wie die Hochfeldverschiebung der L-H δ -Protonen und des R-NHs in *i+1*-Position sowie die starke Tieffeldverschiebung des E-NHs und des Cit-NHs bleiben im Decapeptid **25** erhalten und weisen auf eine ähnliche Konformation und ähnliche Seitenkettenausrichtungen wie in Epitop **1** hin. Die Dodecapeptide **23** und **24** weisen diese Periodizität nicht auf, trotzdem bilden sie sowohl in monomerer als auch in dimerer Form Vorzugskonformationen aus. Eine detaillierte konformationelle Analyse der Monomere und Dimere erfolgt im anschließenden Kapitel 3.8.

Das Octapeptid **26** enthält ausschließlich die Aminosäuren des COCHRAN-Clusters, der eine hohe Signaldispersion im Amid- und H α -Bereich der ¹H-NMR-Spektren anzeigt, jedoch lokale Unterschiede und Besonderheiten aufweist, wie bspw. eine sehr geringe Aufspaltung und Hochfeldverschiebung der Leu-H δ oder eine extreme Hochfeldverschiebung des V-NHs (7.88 ppm im Vergleich 8.82 ppm bei Referenzpeptid **1**, der *random coil*-Wert liegt bei etwa 8.03 ppm^[268]). Ob es sich bei dem Octapeptid überhaupt noch um eine β -*hairpin*-ähnliche Struktur handelt lässt sich nicht genau festlegen, eine typische Abfolge von H-Brücken-gebundenen und nicht-H-Brücken-gebundenen NH-Positionen lässt sich bspw. anhand der ¹H-Temperaturgradienten nicht feststellen. Die Verschiebungswerte der NH-Protonen unterscheiden sich deutlich von denjenigen, die sonst für den hydrophoben Cluster in den längeren Peptiden vorgefundenen werden. Diese Befunde sind insofern nicht verwunderlich, da die Aminosäuren potentiell *turn*-Positionen besetzen und sich das Register sowohl der Wasserstoffbrücken als auch der Wechselwirkungen innerhalb des Clusters verschieben und/oder nicht mehr ausgebildet werden können.

Alle citrullinhaltigen Peptide wurden ELISA-Tests gegen anti-CCP-Antikörper unterzogen, um die Minimalgröße eines biologisch aktiven Epitops zu bestimmen. Zusätzlich dazu wurde das N-terminale Fragment K⁰C¹HWESTCit⁷ **27** eingesetzt. Dieses lineare *random coil*-Peptid mit dem Hapten Citrullin, das sich sechs Aminosäuren weit von der Plattenanbindungsstelle befindet, dient einem direkten Vergleich zum Ausschluss nicht-konformationsspezifischer Effekte. Abbildung 3.38 zeigt die Ergebnisse als Balkendiagramm relativ zu Referenzepitop **1**. Das N-terminale Fragment **27** und das Decapeptid **25** zeigen keine Affinität gegenüber anti-CCP-Antikörpern. Die Präsentation von Citrullin auf einem beliebigen Peptidgerüst ist also nicht ausreichend,^[286] aber auch das Darstellen der essentiellen Cit-G-Sequenz als *turn* einer β -*hairpin*-Struktur, die also die für die Erkennung relevante konformationelle Information enthält,^[272] bringt kein aktives Antigen hervor. Die Wichtigkeit der korrekten räumlichen und chemischen Umgebung des konformationellen Epitops wird hier nochmals unterstrichen und experimentell unterfüttert. Gleiches gilt für das Peptidepitop **24** (-S⁵CitGS⁸-) sowohl in monomerer als auch dimerer Form. Erst mit Einführung einer positiven Ladung in *i*+3-Position, so wie es in den Antigenen **23d** und **23-Ahx-m** (-T⁵CitGR⁸-) der Fall ist, führt zu einer positiven Wechselwirkung mit dem Autoantikörper und damit zu einer messbaren Absorption. Diese Mutation macht nicht einfach nur einen schrittweisen Unterschied, sondern scheint die Aktivität 'anzuschalten', da direkt dieselbe hohe Affinität wie bei Referenz-14er-Peptid **1** erreicht wird. Damit muss das biologische aktive Epitop mindestens 12 Aminosäure enthalten, wobei sich das TCitGR-*turn*-Motiv mit positiver Ladung in *i*+3-Position als essentiell erwiesen hat. Die 12er-Epitope zeigen ungewöhnliche *hairpin*-Konformationen mit der Möglichkeit zur Dimerisierung, die im Folgenden Kapitel genauer untersucht wird. Das 14er-Epitop bildet dagegen verlässlich Monomere mit einer größeren Bandbreite an Modifikationsmöglichkeiten im *turn*-Bereich (-STCitGRS-). Diese beiden Epitopgrößen erweisen sich als nützliche und variable Gerüste für das Antigendesign. Auf das Vergrößern des Epitops wurde verzichtet, da die zusätzlichen Aminosäuren nicht aus der natürlichen Filaggrin-Sequenz ableitbar sind und mit 15 Aminosäuren hochaktive und synthetisch effiziente Peptide erhalten wurden. Für das Überprüfen der *hairpin*-Periodizität auf Grundlage des verwendeten hydrophoben Clusters steht die Addition/Insertion weiterer Aminosäurepaare als weiteres mögliches Designelement zur Verfügung.

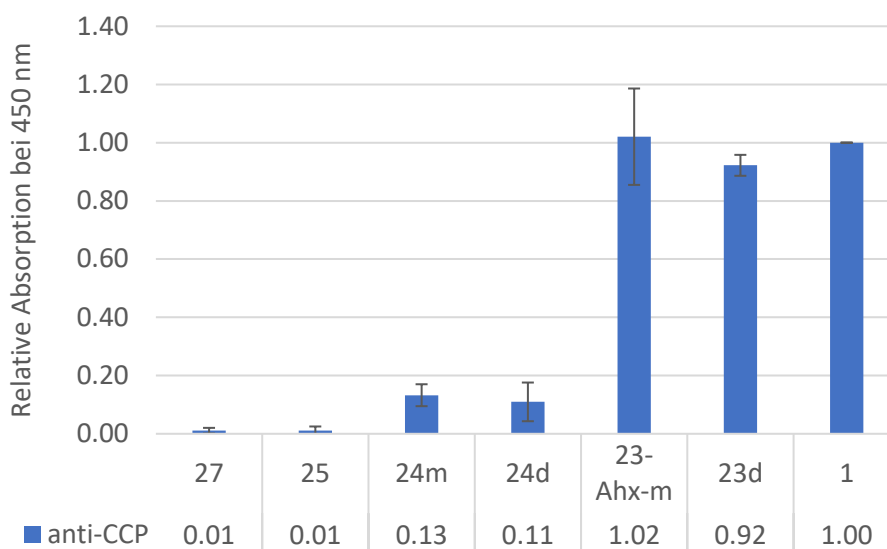


Abbildung 3.38. ELISA-Ergebnisse der in ihrer Länge variierten Peptide **23** bis **25** und **27** relativ zu Referenzpeptid **1** in Form eines Balkendiagramms.

3.8 Acht auf einen Streich - Disulfidreiche Epitop-Dimere und -Monomere

Wie im vorhergehenden Kapitel 3.7 beschrieben zeigten die auf 13 Aminosäuren (12er-*hairpin* + Lys) verkürzten Peptidepitope ein ungewöhnliches Verhalten: Während der Luftoxidation in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer (50 mM, pH = 8.4, $c_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mg/mL}$) wurde, abhängig von der Sequenz, die entropisch ungünstige Dimerisierung beobachtet, welche durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen werden konnten (im Anhang 8.4 sind die entsprechenden Übersichts- und hochaufgelösten Massenspektren abgebildet). Für die Peptide **23** und **24** bedeutet dies also die selektive Ausbildung zweier intermolekularer Disulfidbrücken. In diesem Zusammenhang wurde außerdem ein Tetrathiol-Peptid **28** mit der Sequenz $\text{K}^0\text{C}^1\text{HWE}^5\text{CitGC}^8\text{RLVC}^{12}$ synthetisiert. Wenn man von zwei Monomeren mit je vier Thiolen ausgeht, existieren für deren Oxidation insgesamt 105 Möglichkeiten (96 Dimere und 9 Monomerkombinationen, ohne mögliche Catenan-Strukturen zu berücksichtigen). Der Verlust der Vorzugskonformation würde dementsprechend in einem komplexen Gemisch aus verschiedensten Disulfidspezies resultieren. Wenn jedoch durch ausreichende Präorganisation einer β -*hairpin*-Konformation das Wasserstoffbrückenbindungs-Missverhältnis kompensiert wird, bleibt die Vorzugskonformation des Epitops erhalten. Die zur Luftoxidation aufgenommenen HPLC-Chromatogramme geben eine klare Antwort (Abbildung 3.39): Während der ersten 30 Minuten wird ein Gemisch aus verschiedenen Produkten beobachtet, aber nach einer Stunde tritt ein Hauptpeak hervor. Drei Stunden reichen aus, um die oxidative Faltung trotz der vielen alternativen Faltungsmöglichkeiten und ohne den Gebrauch von

orthogonalen Cystein-Schutzgruppen zu einem einzigen Produkt abzuschließen. Auch in diesem Fall konnte durch Massenspektrometrie anhand der exakten Masse sowie des Ladungs- und des Isotopenmusters die ausschließliche Bildung von Dimeren nachgewiesen werden. Die Faltung des Tetradisulfids verläuft offensichtlich nach dem *collapse*-Modell, bei dem zunächst eine Vielzahl unspezifischer Disulfidbindungen ausgebildet wird, die sich anschließend zum korrekten Faltungsprodukt umstrukturieren (vgl. Abbildung 3.30, rechts).

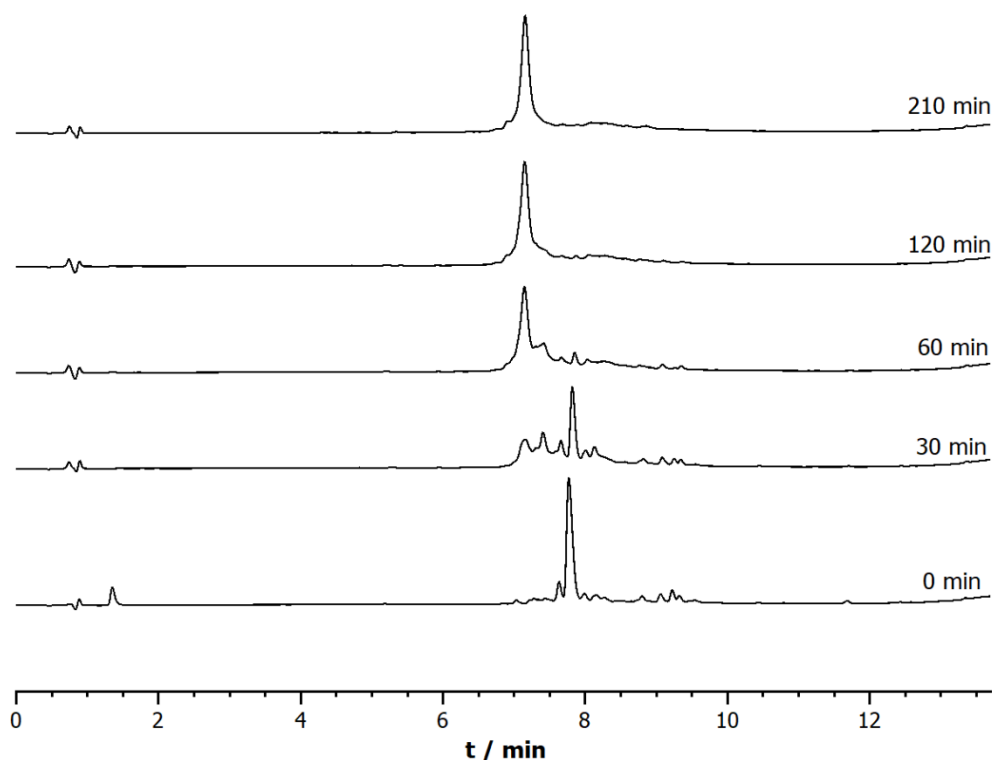
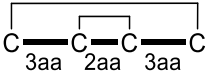
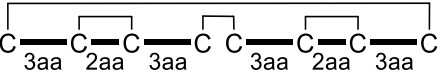
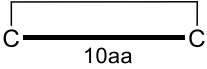
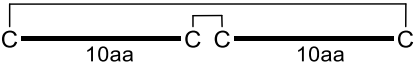


Abbildung 3.39. Die HPLC-Elugramme zeigen die zeitabhängige oxidative Faltung des Tetrathiol-Vorläufers **28** zum Tetra-Disulfid **28d** (in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer, 50 mM, pH = 8.4, $c_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mg/mL}$ bzw. $630 \text{ }\mu\text{M}$; die Absorption wurde bei 230 nm gemessen). Die untere Achse zeigt die tatsächliche Retentionszeit. Die Zeitintervalle, nach denen die Oxidation durch Zugabe von TFA unterbrochen wurde, sind jeweils am rechten Ende der entsprechenden Chromatogramme notiert.^[177]

Die Bidisulfid-Monomere **19** bis **22** dagegen sind Paradebeispiele für das *framework*-Modell, sodass trotz ähnlicher Sequenzen unterschiedliche Oxidationsmodi erreicht werden. Es wurde weitergehend untersucht, ob die Dimere auch unter verdünnten Peptidkonzentrationen (0.1 mg/L bzw. $63 \text{ }\mu\text{M}$ und 0.01 mg/L bzw. $6.3 \text{ }\mu\text{M}$, entsprechende Chromatogramme sind im Anhang 8.5 einzusehen) gebildet werden. Selbst unter diesen Bedingungen, die die Monomerbildung deutlich begünstigen, konnte nur die Dimerisierung der Sequenz **28** beobachtet werden. Dies ist eine bemerkenswerte Eigenschaft, da die Dimerisierung eine

entropisch ungünstige Reaktion darstellt. Die Monomere scheinen dagegen keine stabilen, isolierbaren Produkte zu sein. Bei Tetradisulfid **28d** handelt es sich folglich um ein wahrlich disulfidreiches Peptid, bei dem jede dritte (!) Aminosäure ein Cystein ist.

Tabelle 3.5. Primärstrukturen der cysteinreichen Peptide und die daraus resultierenden monomeren und dimeren Faltungen. Die zugehörigen Motive (dicke Linien, C-naa-C, naa: Anzahl der Aminosäuren) und die Disulfidverknüpfungen (dünne Linien) sind eingetragen. Zusätzlich sind die molaren Verhältnisse der isolierten Monomere und Dimere ($c_{\text{Peptid}} \approx 1 \text{ mg/mL}$ während der Luftoxidation) angegeben (Cit: L-Citrullin, Ahx: 6-Aminohexansäure).^[177]

Primärstruktur	Faltung	
	Monomer	Dimer
Tetracystein		
K-C-H-W-E-C-Cit-G-C-R-L-V-C 28	<5 %	>95 %
K-Ahx-C-H-W-E-C-Cit-G-C-R-L-V-C 28-Ahx	<5 %	>95 %
Bicystein	Monomer	Dimer
		
K-C-H-W-E-S-Cit-G-S-R-L-V-C 24	67 %	33 %
K-C-H-W-E-T-Cit-G-R-R-L-V-C 23	<5 %	>95 %
K-Ahx-C-H-W-E-T-Cit-G-R-R-L-V-C 23-Ahx	>95 %	<5 %

Der Vergleich des Tetradisulfids **28d** mit den monomeren und dimeren Formen von **23** und **24** ist besonders interessant, da die Dimerisierung offensichtlich auf andere Sequenzen übertragbar ist, gleichzeitig aber durch Modifikationen in den zentralen Positionen (5 und 8) sowie an den Termini regulierbar ist (siehe Tabelle 3.5). Sequenz **24** mit Serinen in den Positionen 5 und 8, also ohne die Möglichkeit eine einschränkende Disulfidbrücke zu generieren, bildet, wie im vorhergehenden Kapitel bereits geschildert, sowohl Monomere als auch Dimere aus.

Sequenz **23** (T5,R8) oxidiert ausschließlich zum Dimer, während die N-terminale Addition eines Ahx-Rests in **23-Ahx** zur alleinigen Monomerbildung führt. Über dies hinaus kann bei der Einführung von **Ahx** in das Tetradisulfid **28-Ahx** keine Monomerbildung beobachtet werden, was die exklusive Dimerbildung dieses thiolreichen Motivs (auch mit terminaler Verlängerung, vgl. Kapitel 3.8.6) bestätigt.

Anschließend wurde die Topologie der Disulfidverknüpfung zwischen den beiden Monomereinheiten eines Dimers überprüft, um zwischen einer Bindung zwischen C1-C1'/C12'-C12 oder C1-C12'/C1'-C12 zu unterscheiden. Aussagekräftige Fragmente müssen intakte Disulfidbrücken mit jeweils einer Amid-Fragmentierung auf beiden Cystinseiten aufweisen. MS/MS-Fragmentierungen führten zu keinem solchen Ergebnis, da hier die Disulfide vor den Amid-Brücken gebrochen werden. Deshalb war ein Trypsinverdau der Peptide mit anschließender LC-MS-Messung notwendig (die detaillierte experimentelle Prozedur findet sich im experimentellen Teil wieder). Dieses Enzym hydrolysiert Peptidbindungen vorzugsweise an Arg-Xaa- oder Lys-Xaa-Positionen und sorgt so für die gewünschten Fragmente. Für die dimeren Peptide **23d** und **24d** wurde so eine antiparallele Verknüpfung zwischen N- und C-Terminus der jeweiligen Untereinheiten bestimmt. Tetra-Disulfid **28d** zeigte eine stark erhöhte proteolytische Stabilität gegenüber Trypsin, sodass unter den ansonsten gleichen Bedingungen hauptsächlich intakte Dimere gefunden wurden. Relevante Massenspektren sind im Anhang (Kapitel 8.6) einsehbar.

3.8.1 Konformationelle Analyse der Monomere und Dimere

Um eine erste Aussage über die globale Konformation der Monomere und Dimer zu erhalten, wurden CD-Spektren aufgenommen (Abbildung 3.40). Die Monomere **23m-Ahx** (T5,R8) und **24m** (S5,S8) zeigen ein Maximum bei 227 nm und ein Minimum bei 200 nm mit einer Schulter bei etwa 210 nm. Das Maximum erfährt für die Dimere **23d** und **24d** eine bathochrome Verschiebung zu 232 nm und, anstelle eines Minimums mit Schulter, werden zwei separate Minima bei 200 nm und 215 nm beobachtet. Das dimere Tetradisulfid **28d** (C5,C8) zeigt zusätzliche, interessante Eigenschaften. Für keine bekannte Peptid-Sekundärstruktur werden zwei intensive Maxima bei 234 nm und 224 nm erwartet.

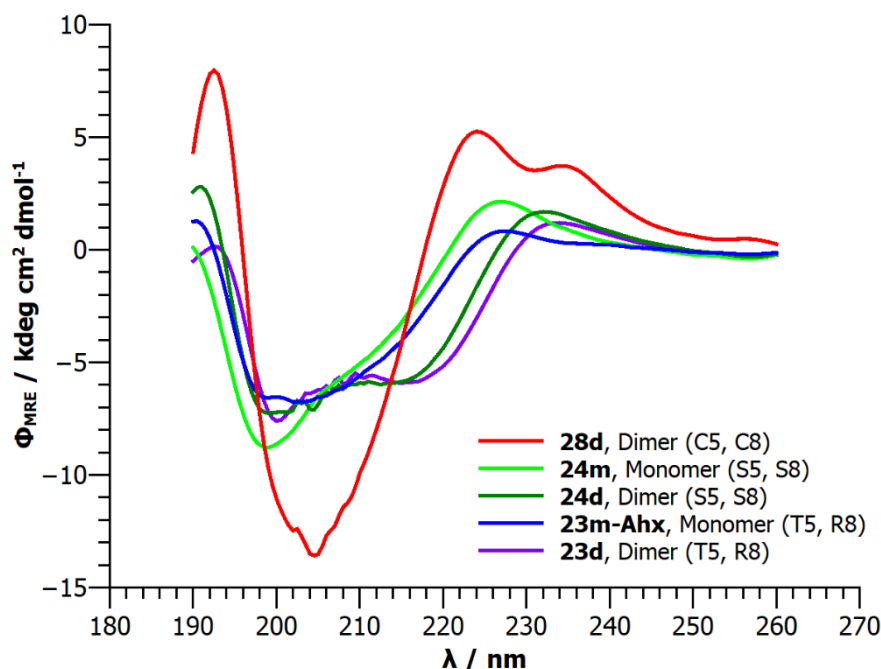


Abbildung 3.40. CD-Spektren der Peptide **23**, **24** und **28** (Monomere sowie Dimere in wässriger Lösung, 200 μ M, 300 K).^[177]

Eine plausible Erklärung ist der Beitrag der zwei Trp-Indol-Seitenketten, die erwartungsgemäß zu einer positiven Bande bei etwa 225 nm und einer negativen Bande bei 200 nm führen.^[306,307] Das sehr intensive Minimum bei 205 nm und die positiven Beiträge zwischen 240 nm und 260 nm sind nur durch diese aromatischen Seitenketten erklärbar.^[308,309] Die CD-Spektren deuten an, dass dieses Phänomen für das Tetradisulfid **28d** deutlich intensiver ausfällt als für die anderen Dimere. Dies könnte an den zusätzlichen zentralen Disulfiden C5-C8 liegen, die die Konformation weiter einschränken und so die Trp-Seitenketten räumlich noch näher zusammenbringen. Die Details der zugrundeliegenden strukturellen Unterschiede wurden mit NMR-Spektroskopie untersucht.

Die NMR-Spektroskopie liefert nicht nur übersichtliche Eigenschaften wie die ^1H -Signaldispersion, sondern auch atomaufgelöste, geometrische Parameter wie 3J -Kopplungskonstanten, NOE-Kontakte und Informationen über Wasserstoffbrückenbindungen (δNH -Temperaturabhängigkeit). Die Peptide wurden in wässriger, phosphatgepufferter Lösung (50 mM, pH = 3.0) bei verschiedenen Temperaturen vermessen. Eine große Signaldispersion korreliert mit einer strukturierten räumlichen Anordnung der Protonen und ermöglicht überhaupt erst die detaillierte Analyse mit 2D-NMR-Methoden. Abbildung 3.41 zeigt die Amidregionen der Dimere **23d**, **24d**, und **28d**. Einige wichtige Änderungen in Bezug auf die Aminosäurepositionen sind darin hervorgehoben. Alle Spektren zeigen eine hohe

Signaldispersion und damit eine Vorzugskonformation in wässriger Lösung an. Die dimeren 24er-Peptide weisen einen 12er-Signalsatz auf, was für eine C₂-symmetrische Struktur spricht. Amid-NMR-Verschiebungen sind generell sehr sensibel gegenüber strukturellen Änderungen,^[268,275] weshalb die größten Veränderungen in der Nachbarschaft zu Position 5 und 8 beobachtet werden. Die extreme Abschirmung des C8-NH in Tetradisulfid **28d** zu außergewöhnlichen 6.21 ppm lässt sich durch den stark abschirmenden Effekt der benachbarten Schwefelatome erklären. Das Gleiche gilt für die C8-H β mit Verschiebungen von 2.14 ppm 0.10 ppm, also auch einer extremen Dispersion. Der hydrophobe Cluster wird von den beiden Seitenkettenpaaren H2/V11 und W3/L10 gebildet und von den benachbarten Paaren C1/C12 und E4/R9 flankiert.^[272,289] Die chemischen Verschiebungen, Seitenkettenrotamere und NOE-Muster erweisen sich als ähnlich unter allen Dimeren. Eine Ausnahme bildet das R9-NH in direkter Nachbarschaft zum Schwefelatom des C8, das in **28d** 0.3 ppm Hochfeldverschoben im Vergleich zu **23d** und **24d** ist. Diese Befunde weisen auf die konformationelle Ähnlichkeit des hydrophoben Clusters in den dimeren Bidisulfiden **23d** und **24d** sowie dem Tetradisulfid **28d** hin. Beweis für die strukturelle Integrität ist außerdem die hohe Dispersion und Hochfeldverschiebung (bis zu -0.4 ppm für alle Dimere) der Leu10-H δ . Die Signalverbreiterung des Tetradisulfids **28d** ist unabhängig von der Konzentration (gemessen mit 1.50 mg/mL / 0.79 mM and 3.00 mg/mL / 1.57 mM, einzusehen in den analytischen Daten der Peptide im experimentellen Teil), sodass eine Aggregation der Moleküle ausgeschlossen werden kann. Bei erhöhten Temperaturen ist der Grund für eine NH-Signalverbreiterung dann chemischer Austausch, während hochaufgelöste, schmale Signale für die nicht-aciden Leu-H δ unter diesen Bedingungen erhalten werden (siehe Anhang 8.7). Der plausibelste konformationelle Prozess, der dieses Verhalten erklärt, ist eine Scharnier-ähnliche Bewegung um die terminalen, intermolekularen Disulfide des stark eingeschränkten tricyclischen Tetradisulfids **28d**, dessen Aktivierungsbarriere hoch genug liegen sollte, um einen schnellen konformationellen Austausch bei Raumtemperatur zu verhindern. Die englische Übersetzung des Wortes Scharnier ist *hinge*, weshalb im Zusammenhang mit der antiparallelen Disulfid-Verknüpfung von N- und C-Terminus auch von antiparallelen *hinge*-Peptiden gesprochen wird. Im Vergleich dazu gibt es in Antikörpern eine parallele *hinge*-Region, bei der sich die Ausrichtung der Stränge parallel in Bezug auf die Termini gestaltet.

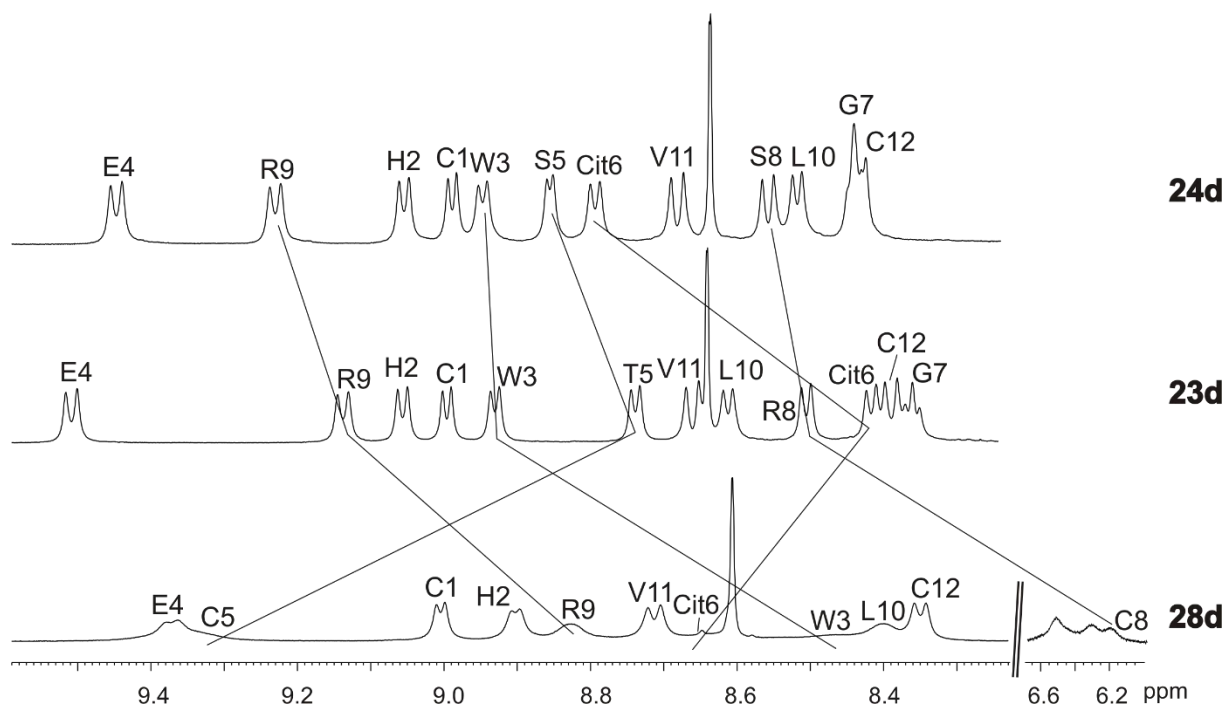


Abbildung 3.41. Amidregion der ^1H -NMR-Spektren der Epitopdimere **23d** (T5,R8), **24d** (S5,S8) und **28d** (C5,C8; 600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D₂O 9:1). Ausgewählte Unterschiede sind hervorgehoben.^[177]

Die Temperaturabhängigkeit der Amidprotonen-Verschiebungen im ^1H -NMR liefert Informationen über ihre Lösungsmittelzugänglichkeit im gefalteten Zustand.^[261] NH-Protonen mit einer hohen Temperaturabhängigkeit, angegeben in ppb/K, sind zum Lösungsmittel (Wasser) orientiert, während sich solche mit kleinen Werten in intramolekularen/*interstrand*-Wasserstoffbrücken oder innerhalb einer hydrophoben Umgebung befinden. Ein regelmäßiges Muster an H-gebundenen und nicht-H-gebundenen Amidprotonen ist charakteristisch für eine β -*hairpin*-Struktur. Gleiches gilt für eine kontinuierliche Sequenz an *interstrand*-NH/NH, -NH/H α und -H α /H α -NOE-Kontakten. Beide Parameter sind in Abbildung 3.42 für das Tetradisulfid **28d** gezeigt und liefern Beweise für das Vorliegen einer β -*hairpin*-Struktur, die durch den hydrophoben Cluster stabilisiert wird. Ähnliche bis gleiche Muster werden für die beiden Peptiddimere **23d** und **24d** beobachtet (siehe auch Abbildung 3.44 weiter unten). Unterschiede finden sich in der *turn*-Region: Die Amidprotonen von C5 und C8 in **28d** zeigen eine geringe Temperaturabhängigkeit und müssen dementsprechend vom chemischen Austausch mit dem Solvens abgeschirmt sein. Für die Aminosäuren in Position 5 und 8 in den Dimeren **23d** und **24d** ist dies nicht der Fall. Das zusätzliche, zentrale Disulfid C5-C8 in **28d** beeinflusst die Bindungsgeometrie des *turns* und somit auch die Orientierung der zugehörigen Amide.

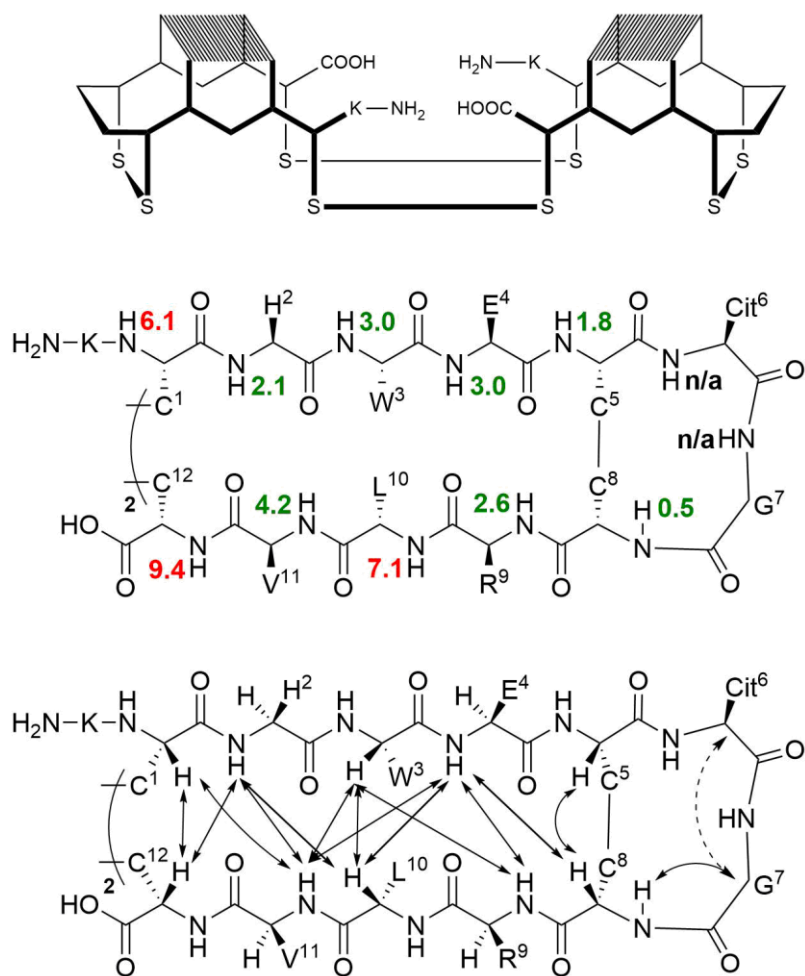


Abbildung 3.42. Tetradisulfid **28d** (schematische Zickzack-Darstellung, oben, „S“ stellt die Schwefelatome der Cysteinseitenketten dar), zugehörige Temperaturgradienten in ppb/K (Mitte) und beobachtete NOE-Muster der NH- und H α -Protonen (unten).^[177]

Des Weiteren wurden monomere und dimere Spezies direkt miteinander verglichen, um weitere konformationelle Details in Bezug auf den Dimerisierungsprozess herauszuarbeiten. Da für die Tetrathiolsequenz **28** das zugehörige Monomer nicht isoliert werden konnte, liefern hier vor allem die Monomere **23m** und **24m** wichtige Einblicke und decken analoge Zusammenhänge auf. Abbildung 3.43 stellt die L10-H δ - und die Amidregionen der ¹H-NMR-Spektren von **24m** und **24d** (S5,S8) gegenüber. Die geringe Dispersion der L10-H δ des Monomers (0.69 ppm und 0.41 ppm im Vergleich zu 0.41 ppm and -0.31 ppm für Dimer **24d**) weist auf eine Destabilisierung des hydrophoben Clusters hin. Das Peptid liegt somit noch nicht in seiner energetisch günstigsten Konformation vor. Gleichzeitig weisen die NH-Signale eine sehr hohe Dispersion im Monomer **24m** auf. Die chemischen Verschiebungen von C1-, H2-, W3- sowie L10-, V11- und C12-NH, die alle Bestandteile des hydrophoben Clusters sind, bleiben im Vergleich zum Dimer nahezu konstant. Die auffälligsten Veränderungen, nämlich eine

intensive Hochfeldverschiebung (hervorgehoben in Abbildung 3.43), werden für die übrigen Aminosäuren beobachtet. Diese analytischen Daten weisen auf einen eher helikalen *bulge loop* in der monomeren Struktur (die gleichen Daten werden für **23m-Ahx** gefunden) hin.^[310,311] Die Dimere dagegen bilden scheinbar einen flacheren 4:4 *turn* aus.

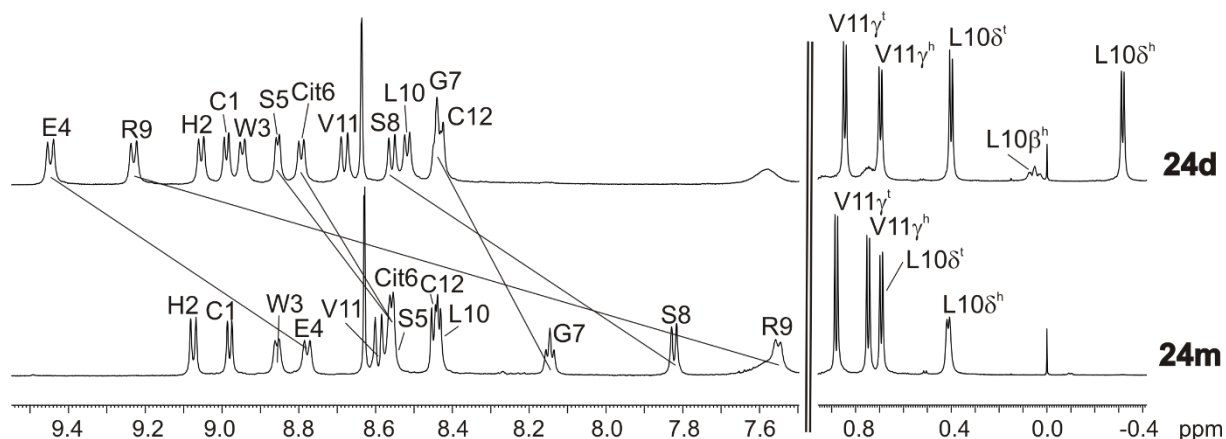


Abbildung 3.43. L10-H δ - und die Amidregionen der ^1H -NMR-Spektren von Monomer **24m** und Dimer **24d** (S5,S8, 600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D $_2$ O 9:1). Ausgewählte Besonderheiten sind hervorgehoben.^[177]

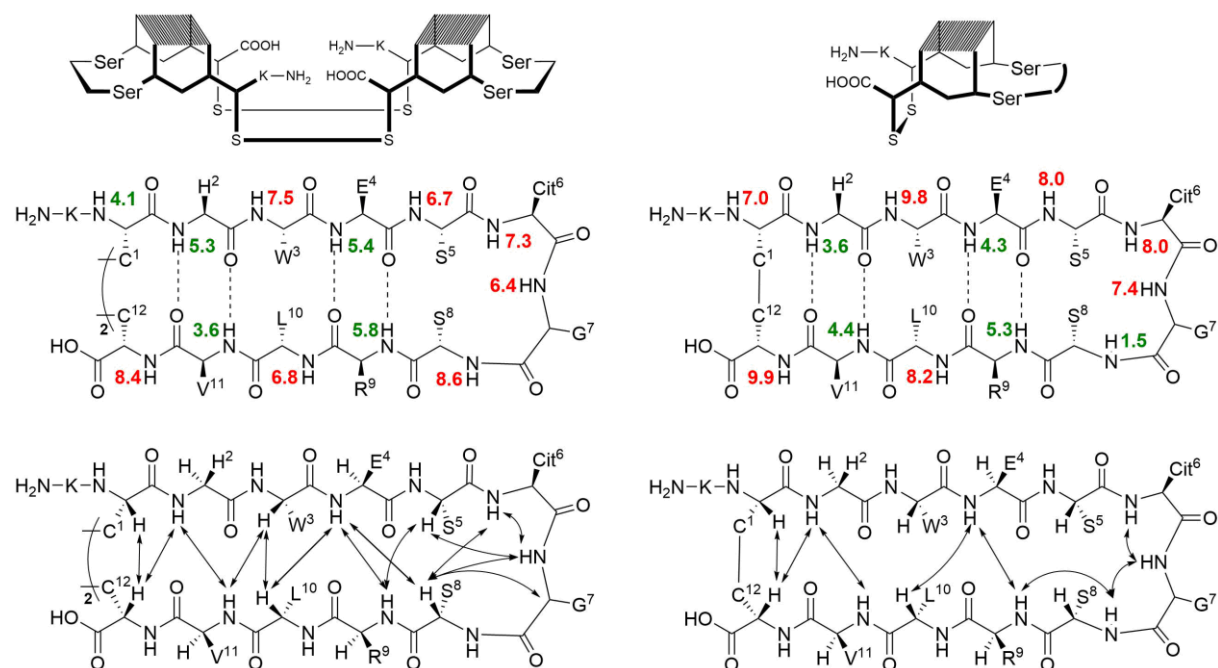


Abbildung 3.44. Temperaturgradienten des Dimers **24d** (links) und des Monomers **24m** (rechts; schematische Zickzack-Darstellung, oben, „S“ stellt die Schwefelatome der Cysteinseitenketten dar), in ppb/K (Mitte) und beobachtete NOE-Muster der NH- und Ha-Protonen (unten).^[177]

NH-Temperaturgradienten und *backbone-interstrand*-NOE-Kontakte des Monomers **24m** und des Dimers **24d** sind in Abbildung 3.44 abgebildet. Für das Monomer werden wesentlich weniger NOE-*interstrand*-Kontakte beobachtet, dafür aber einer Serie von NH/NH-Kopplungen in der *turn*-Region (Cit6-G7-S8-G9). Dies unterstützt die Annahme einer helikalen *turns*, bei dem die Amidprotonen in den makrocyclischen Peptidring hinein orientiert sind. Letzteres und die Tatsache, dass das S8-NH in Monomer **24m** eine geringe Temperaturabhängigkeit aufweist, sind die entscheidendsten Unterschiede zum Dimer **24d**. Kleine Veränderungen in der Orientierung der Amidprotonen, dem Wasserstoffbrückenmuster und der *turn*-Struktur scheinen also verantwortlich für die Bildung von Monomer oder Dimer zu sein.

Interessanterweise sorgen also die unterschiedlichen *turn*-Regionen des Monomers für geometrische Veränderungen in den terminalen Bereichen des *hairpins*, sodass die Verknüpfung der Disulfide von intra- zu intermolekular wechselt. Es wird eine Grundzustandsdestabilisierung des 12er-Monomers vermutet (Abbildung 3.45). Der helikale *bulge turn* fügt sich nicht optimal in die Verdrillung (*twist*) und die Krümmung (*bending*) eines stabileren β -*hairpins* ein, der durch den hydrophoben Cluster (C1-E4 und R9-C12) fixiert wird. Daraus folgt, dass die monomere Konformation thermodynamisch ungünstig wird und sich die Energiebarriere für einen konformationellen Austausch senkt, was durch den Dimerisierungsprozess wiederum kompensiert wird.

Der Grund für die intrinsische Instabilität des 12er-Monomers liegt in der in Kapitel 3.7, Abbildung 3.37, beschriebenen ungewöhnlichen *hairpin*-Periodizität. Das inkongruente Muster an Aminosäurepaaren und Wasserstoffbrückenbindungen könnte die Tendenz zur Dimerbildung erklären. Nichtsdestotrotz ist es möglich, die 12er-Monomere (teilweise durch die Manipulation des N-Terms) zu erhalten, die außerdem eine hohe Dispersion im ^1H -NMR-Spektrum aufweisen. Diese ungewöhnlichen Ergebnisse können deshalb nur durch den *hairpin*-stabilisierenden Effekt des hydrophoben Clusters erklärt werden. Er ist ein wertvolles *hairpin*-Designelement, das je nach Sequenz und konformationellen Eigenschaften die Monomerbildung erlaubt, gleichzeitig aber eine Dimerisierung überhaupt erst möglich macht (vgl. Abbildung 3.45).

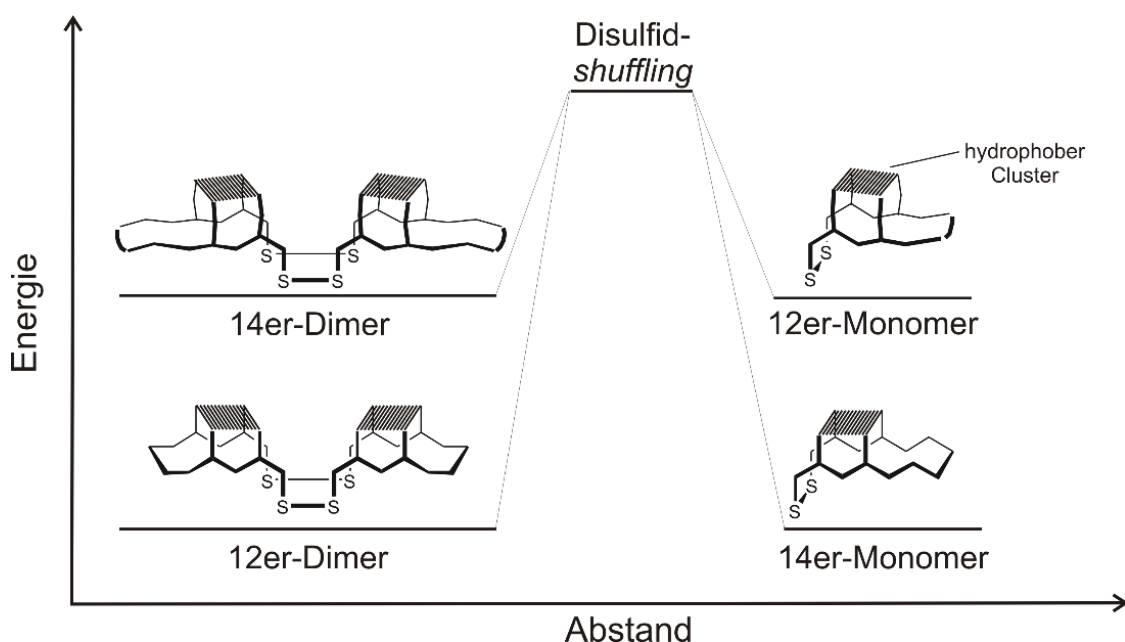


Abbildung 3.45. Schematische Darstellung der thermodynamisch kontrollierten *hairpin*-Faltung. Eine mögliche Grundzustandsdestabilisierung des 12er-Monomers führt zur Bildung einer thermodynamisch begünstigten Dimerkonformation. Das 14er-Peptid liegt dagegen ausschließlich in einer ausreichend stabilen, monomeren Konformation vor (also nicht als Dimer). Der auf der X-Achse beschriebene Abstand beschreibt die tatsächlich vorliegende räumliche Entfernung, um ein Disulfid-*shuffling* durch kooperative Dynamik zu ermöglichen oder nicht zu ermöglichen.^[177]

Die Frage danach, warum ausgerechnet die Dimerbildung über zwei intermolekulare Disulfidbrücken trotz des entropischen Nachteils so klar bevorzugt wird, dass kein Monomer mehr nachweisbar ist, bleibt bestehen. Da sich die Disulfidverknüpfungen an die inhärente Dynamik eines β -*hairpins* mit seiner Akkordeon-ähnlichen Bewegung^[59] (vgl. Einleitung 1.2.1) anpassen müssen, sollte das *twisting* und *bending* des Peptidrückgrats während der Monomerpaarung synergetisch ablaufen.^[312] Die Hypothese lautet, dass die ständige Hin- und Her-Bewegung von zwei terminalen Thiolen durch die identische, komplementäre Bewegung eines zweiten Moleküls aufeinander abgestimmt wird. Dabei verhalten sich die C1-C12'- und C1'-C12-Disulfide wie die Kurbelwelle (engl. *crankshaft*) einer Dampflokomotive. Diese Hypothese, die auf den derzeitigen Beobachtungen beruht, dient als Grundlage für weitergehendes Peptiddesign von Monomer- und Dimerspezies.

Alle analytischen Daten und Überlegungen dienen als Grundlage für ein NMR-basiertes Modell des dimeren Tetradisulfids **28d**. Abbildung 3.46 zeigt das C₂-symmetrische Peptid samt Sekundärstrukturelemente. Das -CX₃CX₂CX₃C-Motiv innerhalb des kompakten *hairpin*-Gerüsts bringt eine große Vielfalt an chemischer Funktionalität in räumliche Nähe.

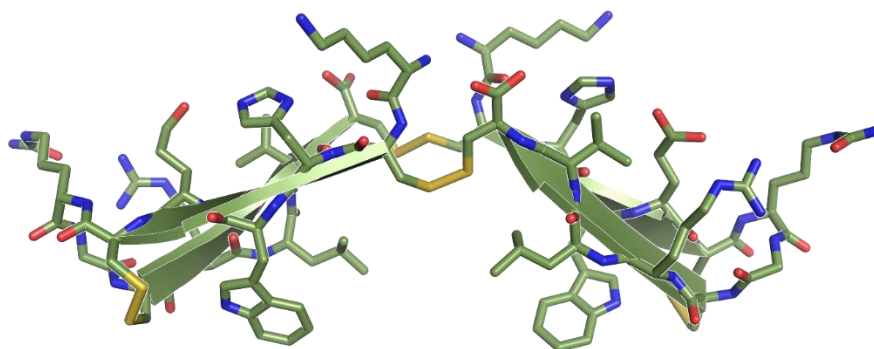


Abbildung 3.46. NMR-basiertes Modell des Tetradisulfids **28d**. Die V-förmige Anordnung der zwei monomeren Untereinheiten wurde per Ionenmobilitätsspektrometrie (siehe Kapitel 3.8.2) bestimmt und wurde in der Darstellung berücksichtigt.^[177]

3.8.1.1 Lösungsmittelwechsel: Das Tetradisulfid 28d in DMSO

Um die Stabilität und Besonderheiten der dimeren Faltung zu überprüfen, wurde das Tetradisulfid **28d** auch in DMSO_{d6} NMR-spektroskopisch vermessen. Das stark polare, aprotische Lösungsmittel sorgt für eine vollständig andere chemische Umgebung, sodass klassische hydrophobe Effekte, die in wässriger Lösung auftreten und die Peptid-/Proteinfaltung begünstigen,^[313,314] unter diesen Bedingungen wegfallen. In Abbildung 3.47 sind entsprechende NH- und Hochfeld-Ausschnitte der ¹H-NMR-Spektren bei Temperaturen von 300 K bis 350 K gezeigt, darunter die abgelesenen Temperaturgradienten in ppb/K. Es fällt sofort auf, dass eine hohe Dispersion der amidischen Signale erhalten bleibt und die L10-Hδ-Signale stark in das Hochfeld verschoben sind. Eine Vorzugskonformation liegt also vor, der hydrophobe Cluster bildet sich auch in DMSO aus. Die außergewöhnliche Hochfeldverschiebung des C8-NH zu 6.21 ppm in Wasser tritt hier nicht auf. Dies muss eine Folge der unterschiedlichen Solvation und des im Wasser auftretenden hydrophoben Effekts sein. Das hochfeldigste NH-Proton ist in diesem Fall das G7-NH, das in Wasser durch konformationellen Austausch stark verbreitert und deshalb nicht einsehbar ist. Ein direkter Vergleich der chemischen Verschiebungen für die beiden verschiedenen Lösungsmittel ist aufgrund der doch sehr unterschiedlichen Eigenschaften nicht sinnvoll.

Auch in DMSO können Informationen aus den Temperaturgradienten gezogen werden: Intramolekulare Wasserstoffbrücken werden bei Erhöhung der Temperatur nicht so leicht gespalten wie intermolekulare oder solche zum Solvens, da sich bei letzteren die Entropieabnahme, die durch Oligomerisierung oder Solvensbindung eintritt, mit steigender Temperatur immer stärker auf die freie Enthalpie auswirkt.^[261] Diese Tatsache gilt für alle Wasserstoffbrücken-bildenden Lösungsmittel, so auch DMSO. Generell wird angenommen,

dass $\Delta\delta/\delta T$ -Werte von 4.0 ppb/K oder höher auf solvensexponierten Protonen zutreffen, während kleinere Werte eher für eine Abschirmung vom Lösungsmittel sprechen.^[261,315] Die hier gemessenen Temperaturgradienten (Abbildung 3.47 unten) zeigen den für ein antiparalleles β -sheet typischen Verlauf von abwechselnd H-Brücken-gebundenen und nicht-H-Brücken-gebundenen NH-Protonen und zeigen damit ein ähnliches Verhalten wie in Wasser (vgl. Abbildung 3.42). Weiterhin ist zu beobachten, dass die amidischen Signale bei niedrigeren Temperaturen verbreitert sind, während sie bei zunehmenden Temperaturen wieder schärfer werden. Dies spricht für einen konformationellen Austausch, der ein erneuter Hinweis auf die in den vorhergehenden Kapiteln erwähnte Scharnierbewegung des dimeren *hairpins* sein könnte.

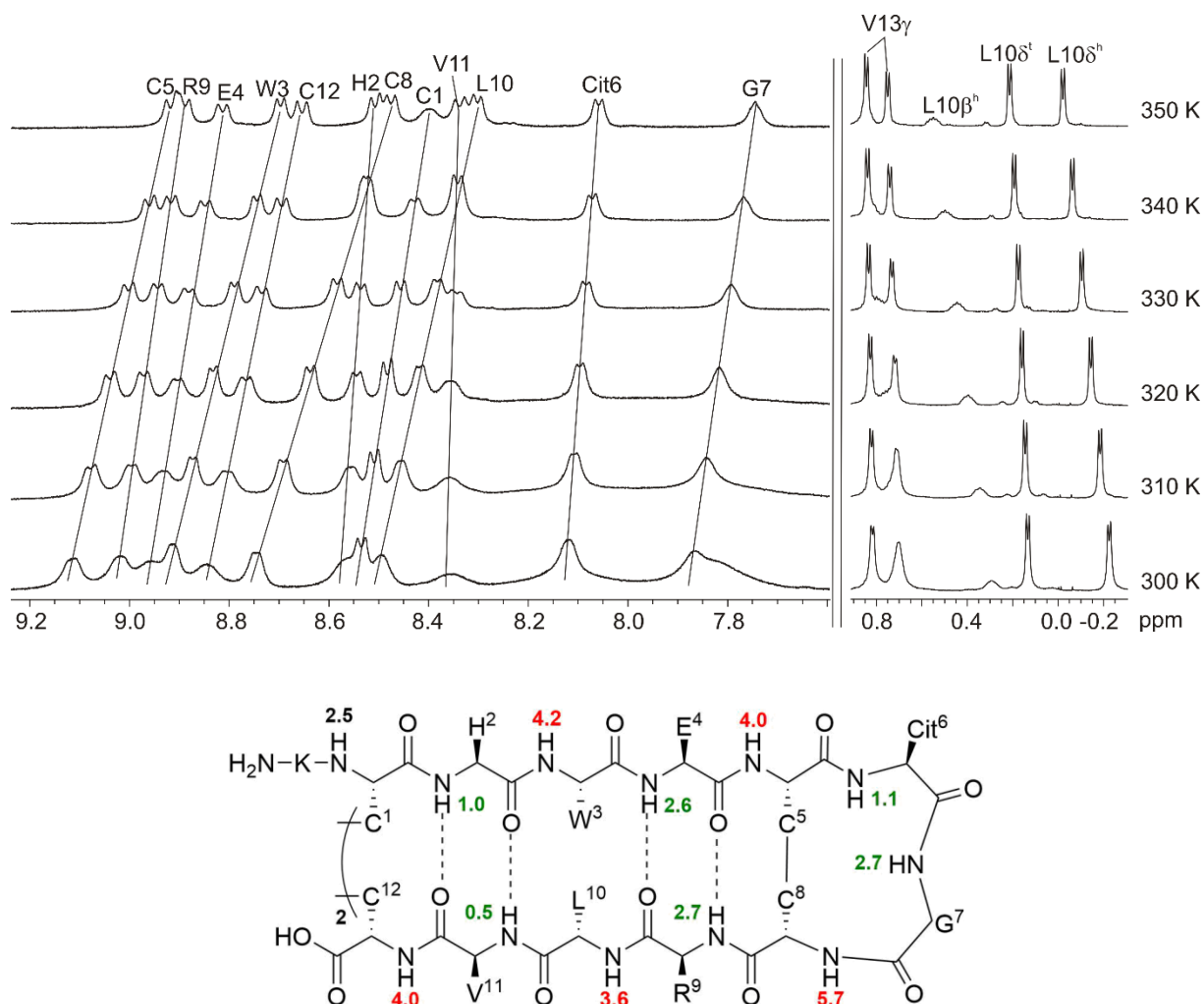


Abbildung 3.47. Amid- und Alkylbereich der ^1H -NMR-Spektren (oben, 600 MHz, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D₂O 9:1) von Tetradisulfid **28d** bei 300 K bis 350 K. Darunter finden sich die daraus abgelesenen, in einer schematische LEWIS-Formel eingetragenen Temperaturgradienten in ppb/K.

Die analytischen Daten in DMSO beweisen, dass in diesem organischen Lösungsmittel, das auch zur Denaturierung von Peptid-/Proteinstrukturen verwendet wird,^[316] ebenfalls eine Vorzugskonformation des Tetradisulfids **28d** vorliegt. Die Temperaturgradienten weisen sogar auf einen intakten β -*hairpin* hin. Somit wird die Stabilität und vielseitige Verwendbarkeit des dimeren Tetradisulfid-Motivs nochmals unterstrichen.

3.8.2 Ionenmobilitätsspektrometrie

Das intermolekulare Bidisulfid erschafft einen antiparallelen *hinge* ('Scharnier'), sodass die Dimere eine gestreckte oder V-förmige Anordnung bezüglich der beiden *hairpin*-Fragmente einnehmen kann. Gleichzeitig kann es sich auch um eine dynamische Bewegung handeln, die zwischen diesen beiden Zuständen unter Symmetrieeerhalt wechselt. Um einen möglichen Öffnungswinkel des Scharniers zu bestimmen, wurde sich der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) bedient. Dabei werden Ionen in einem elektrischen Feld gegen einen Gasstrom bewegt, wobei sich große Moleküle durch erhöhte Stoßzahl langsamer durch die Drift-Röhre bewegen als kleine Moleküle. So können auch Moleküle unterschieden werden, die zwar das gleiche Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufweisen, aber unterschiedliche Konformationen.^[317,318] Die für die Monomere und Dimere gemessenen Driftzeiten sind unter ansonsten gleichen Bedingungen (Details im experimentellen Teil) stoffspezifische Größen. Es ist daher wichtig festzustellen, dass die Driftzeiten unter allen Dimeren bzw. unter allen Monomeren reproduzierbar sind und sich ähneln, was die strukturelle Ähnlichkeit der disulfidverbrückten Spezies untereinander erneut bestätigt.

Aus der Driftzeit, die mit dem Ladungszustand der Peptide korreliert wird, lassen sich über die MASON-SCHAMP-Gleichung Stoßquerschnitte (*collisional cross sections*, CCS) errechnen, wenn das Messinstrument auf Polyalanin-Derivate kalibriert wurde (siehe experimenteller Teil).^[319,320] Die gemessenen Spektren, erhaltene Driftzeiten und daraus errechnete CCS-Werte sind im Anhang 8.8 einsehbar. Wenn die Dimere eine gestreckte Konformation einnehmen, sollte der CCS etwa Doppelt so groß sein wie derjenige eines Monomers. Für eine gewinkelte Anordnung bedeutet dies einen relativen CCS (Dimer/Monomer) von kleiner als zwei. Die Messungen ergaben einen Dimer-CCS, der etwa 1.7mal so groß wie der eines Monomers ist. Folglich sollte der antiparallele *hinge* zeitgemittelt in einer V-förmigen Konformation vorliegen. Auch wenn es sich dabei um ein vorläufiges Bild des Peptiddimers in der Gasphase handelt, liefert es erstmalig konkrete experimentelle Daten, um die Scharnierbewegung eines solchen intermolekularen Disulfids zu bestimmen. Abbildung 3.48 enthält Molekülabbildungen des Dimers **28d** mit verschiedenen Öffnungswinkeln von vollständig gestreckt (oben) bis stark

gewinkelt (unten). Die IMS-Daten führen zu einem mittleren Öffnungswinkel (Abbildung 3.48, Mitte) zwischen diesen beiden Extrema. Die gemessene Dimerlänge (von Cit7 α zu Cit7' α) könnte damit ein Zeichen für eine zeitliche Mittelung der Scharnierbewegung sein. Die verwendeten analytischen Methoden können jedoch nicht unterscheiden, ob es sich bei der V-Form um die Hauptkonformation handelt, oder ob sie von eben jener konformationellen Mittelung herrührt.

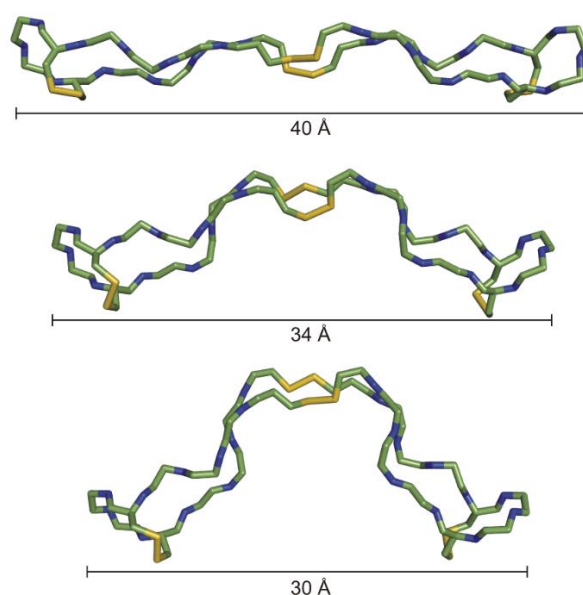


Abbildung 3.48. Graphische Darstellung verschiedener Öffnungswinkel des antiparallelen *hinge*-Peptids **28d** (*backbone* ohne Seitenketten). Oben: Vollständig gestrecktes Epitop (40 Å Länge von Cit7 α zu Cit7' α); Mitte: experimentell ermittelte Länge (IMS, 34 Å); unten: stark gewinkelte Struktur (30 Å).^[177]

3.8.3 Temperaturabhängige CD-Spektroskopie des Tetradisulfid-Dimers

Die beschriebene *hinge*-Struktur des Tetra-Disulfid-Dimers **28d** sollte dafür sorgen, dass sich die Tryptophane der beiden monomeren Untereinheiten räumlich annähern, sodass ein *Exciton-Coupling* möglich wird (vergleiche Kapitel 3.8.1). Es wurden CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen (300 K, 305 K, 310 K und 320 K) gemessen (Abbildung 3.49), sodass eine mögliche Abhängigkeit der langwelligeren CD-Signale bei etwa 230 nm, die von den W3/W3'-Seitenketten stammen, von einer erhöhten molekularen Bewegung festgestellt werden kann. Dabei bleiben alle Spektren unverändert. Dementsprechend ist die globale Konformation über den gewählten Temperaturbereich stabil (was bereits durch die NMR-Spektren in Wasser und DMSO bei bis zu 350 K gezeigt werden konnte, siehe Kapitel 3.8.1). Für die *hinge*-Bewegung

ergeben sich folgende Überlegung: mit steigender Temperatur erhöht sich zwar deren Frequenz, im zeitlichen Mittel bleibt sie aber konstant, sodass sich auch die Intensität der CD-Signale nicht verändert. Andererseits könnte die Hauptkonformation so stabil sein, dass sie über den gewählten Temperaturbereich keine Veränderungen für den Öffnungswinkel ergeben.

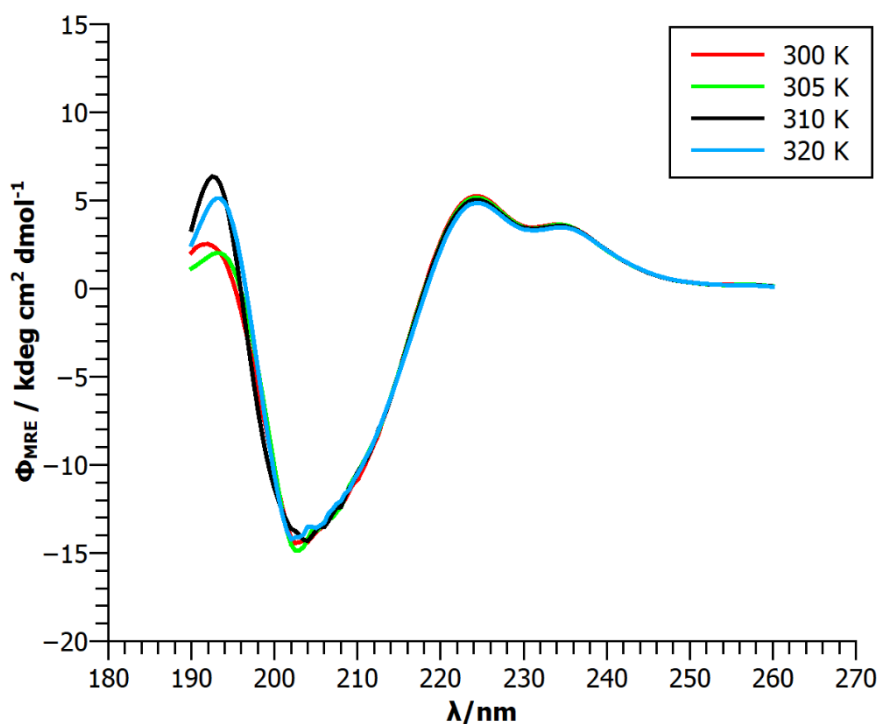


Abbildung 3.49. CD-Spektren von Epitop-Dimer **28d** bei verschiedenen Temperaturen ($C_{\text{Peptid}} = 200 \mu\text{mol/L}$ in wässriger Lösung).

3.8.4 Heterodimere - Korrelierte Bewegungen

Die Tetradisulfid-Dimere bilden sich nur dann aus, wenn die dynamische Beweglichkeit der beiden monomeren *hairpin*-Einheiten miteinander korreliert und aufeinander abgestimmt ist. Aus diesem Grund sollte die Dimerisierung von zwei identischen Peptidmonomeren bevorzugt ablaufen. Nichtsdestotrotz gelang es, aus den Vorläufer-Thiol-Sequenzen **23** und **24** ein Heterodimer **29d** zu erhalten und zu isolieren. In Abbildung 3.50 findet sich ein Vergleich der Leu-H δ - und Amid-Regionen aus den ^1H -NMR-Spektren der genannten Dimere wieder. Über den *sequential walk* im NOESY-Spektrum konnten Signale, die durch den Symmetriebruch in **29d** eine unterschiedliche chemische Umgebung innerhalb der Monomer-Untereinheiten aufweisen, dem jeweiligen *hairpin*-Monomerbaustein zugeordnet werden (Details mit NOESY-Spektren und Erläuterungen finden sich im Anhang 8.9 wieder). Die Verschiebungswerte der W3-NH, E4-NH und R9-NH sowie der L10-H δ sind im Vergleich zu den jeweiligen Dimeren

in den monomeren Untereinheiten vertauscht. Gleiches gilt für R8 bzw. S8'. Dieses Verhalten ist ein Hinweis darauf, dass die monomeren Untereinheiten miteinander in Korrelation stehen und die Verschiebung einiger Protonen, im Besonderen der genannten, von der Beweglichkeit und dem Substitutionsmuster der gegenüberliegenden Monomereinheit abhängig ist. Für eine detailliertere Aussage über den tatsächlichen Zusammenhang zwischen den beiden Untereinheiten müssen weitere Heterodimere synthetisiert werden. Das Heterodimer **29d** ist jedenfalls nicht einfach durch die Summe seiner Einzelteile abbildbar. Inter-Monomer-NOE-Kontakte sind nicht eindeutig feststellbar, auch aufgrund der Vielzahl an teils überlappenden NMR-Signalen.

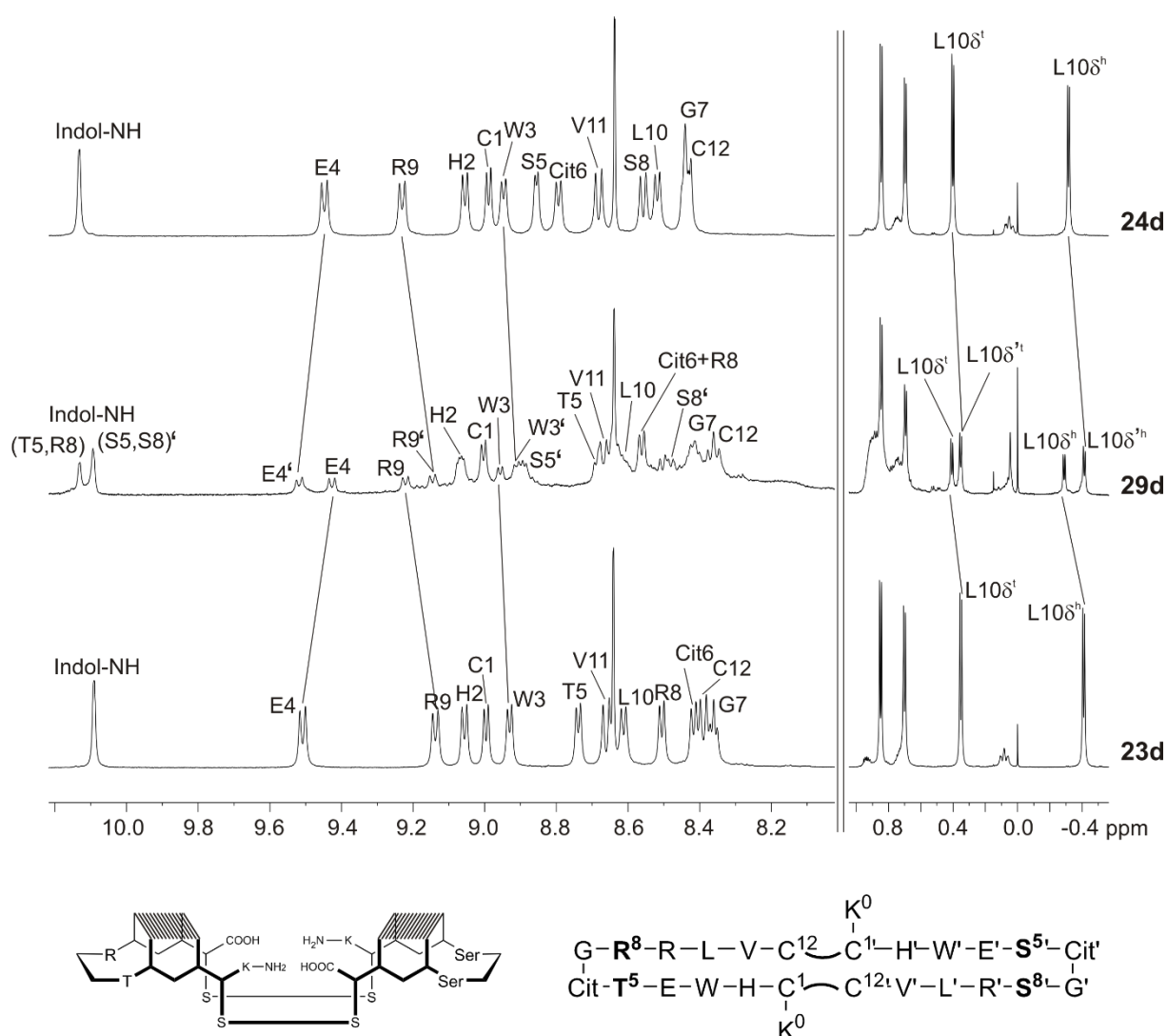


Abbildung 3.50. L10-Hδ- und die Amidregionen der ¹H-NMR-Spektren der Homodimere **23d** (T5,R8) und **24** (S5,S8) sowie des daraus abgeleiteten Heterodimers **29d** (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D₂O 9:1). Am unteren Ende ist die Sequenz (rechts) sowie eine schematische Darstellung des Heterodimers (links) abgebildet.

Das intermolekulare Bidisulfid **29d** beweist, dass eine Heterodimerisierung generell möglich ist und auch unsymmetrische Monomerpaare in ihrer Beweglichkeit aufeinander abgestimmt werden können. Weitere Beispiele mit unterschiedlichen *turn*-Regionen könnten tiefergehende Erkenntnisse darüber liefern, welche Eigenschaften zur gezielten Heterodimerisierung vonnöten wären und welche Symmetrieeigenschaften Heterodimere im Vergleich zu den jeweiligen Homodimeren aufweisen. So könnten gezielt Derivate synthetisiert werden, die über inter-Monomer-NOE-Kontakte gezielt zu Hinweisen auf die Beschaffenheit der Dimer-Scharnierbewegung führen.

3.8.5 Die Komplexität einer fehlgeschlagenen Cystein-Oxidation

Ein weiterer modularer Design-Ansatz führte zur Kombination des Tetradisulfids (Dimerisierung + Bidisulfid) mit dem Doppel-D-Motiv. Dabei wurden die L-Cysteine in Position 5 und 8 durch deren D-Form ausgetauscht, sodass das Tetrathiol **30** erhalten wurde. Hier ergab sich ein vollständig anderes Bild bei der Luftoxidation als bei Tetrathiol **28** (vgl. Abbildung 3.39). Die HPLC-Chromatogramme in Abbildung 3.51 zeigen im zeitlichen Verlauf, wie aus einem einzelnen Hauptpeak von Peptid **30** innerhalb von wenigen Stunden ein komplexes Gemisch aus einer Vielzahl an Oxidationsprodukten entstehen kann.

Es handelt sich um ein repräsentatives Beispiel für eine unselektive oxidative Faltung. Die erwartete dimere Spezies kann dabei massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Die invertierte Konfiguration und damit die Ausrichtung der D-Cystein-Seitenketten verändert also eine mögliche Vororientierung der Monomerbausteine untereinander, wodurch eine regioselektive Disulfidbildung nicht mehr möglich ist. Diese experimentellen Daten stellen außerdem unter Beweis, welche Herausforderungen die Oxidation von vier Thiolen ohne orthogonale Schutzgruppen an den Experimentator stellen, und unterstreichen dementsprechend die besondere Eignung des Tetra-L-Cystein-Motivs **28** für regioselektive oxidative Faltung.

Außerdem lohnt ein Vergleich mit den D-Disulfid-enthaltenden 14er-*hairpins* aus Kapitel 3.6: Mit der passenden *hairpin*-Periodizität ist die Oxidation der Tetrathiol-Vorläufersequenzen ohne Weiteres und sogar unter Isolierung eines Monodisulfid-Oxidationsprodukts möglich. Die Kombination aus Sekundärstruktur-beeinflussenden D-Aminosäuren und unpassender *hairpin*-Periodizität in der vorliegenden 12er-Sequenz **30** kann in diesem Fall nicht mehr durch den hydrophoben Cluster überkompensiert werden und es erfolgt auch keine gezielte Dimerisierung.

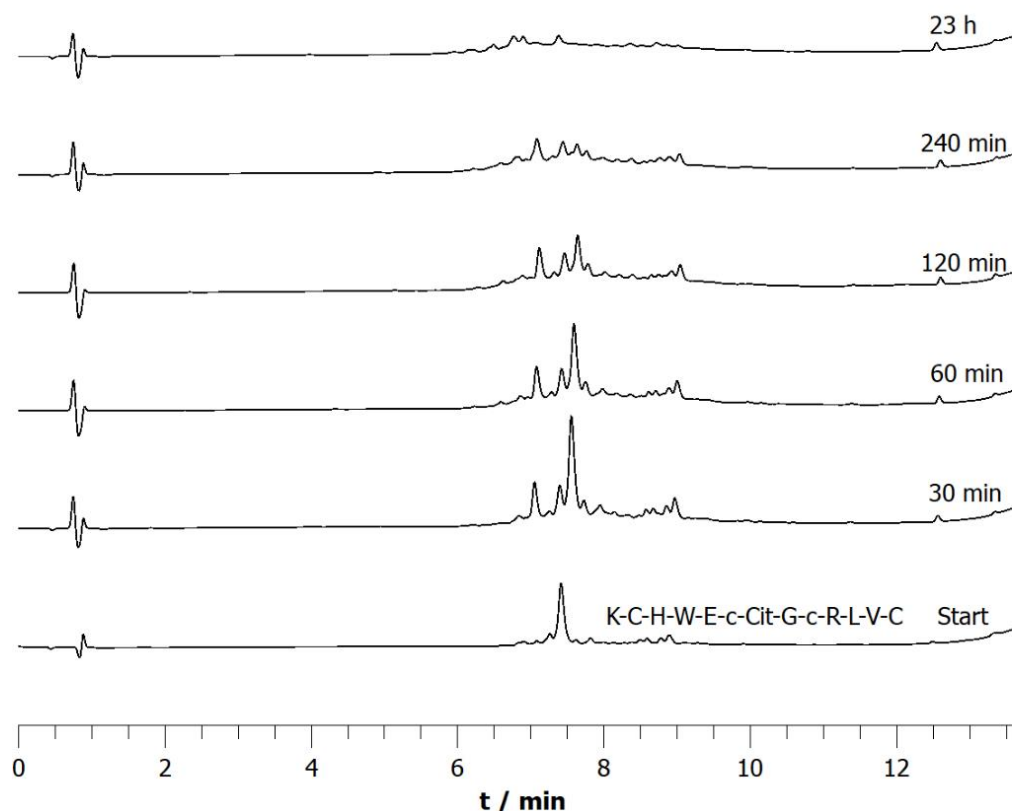


Abbildung 3.51. Die HPLC-Elugramme zeigen die zeitabhängige oxidative Faltung des Tetrathiol-Peptids **30** (in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer, 50 mM, pH = 8.4, $c_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mg/mL}$ bzw. $630 \mu\text{M}$; die Absorption wurde bei 230 nm gemessen). Die untere Achse zeigt die tatsächliche Retentionszeit. Die Zeitintervalle, nach denen die Oxidation durch Zugabe von TFA unterbrochen wurde, sind jeweils am rechten Ende der entsprechenden Chromatogramme notiert.

3.8.6 N- und C-terminale Variation des dimeren Tetradisulfid-Motivs

Das tricyclische Tetradisulfid **28d** stellt ein außergewöhnliches *hairpin*-Motiv dar, dass ohne den Gebrauch von orthogonalen Cystein-Schutzgruppen regioselektiv vier Disulfidbrücken ausbildet, von denen zwei intermolekulare für eine Scharnier-ähnliche Anordnung sorgen. Die Übertragbarkeit der Dimerisierung wurde bereits anhand der unterschiedlichen Bidisulfide **23** (T5,R8) und **24** (S5,S8) nachgewiesen. Für die breitere Anwendbarkeit des Tetradisulfid-Motivs wurden weitere Modifikationen an den N- und C-Termini vorgenommen. Die Sequenzen $\text{C}^1\text{HWE}^5\text{CitGC}^8\text{RLVC}^{12}\text{K}^{13}$ **31**, bei der L-Lysin am C- statt am N-terminalen Ende angebracht wurde, und $\text{K}^0\text{C}^1\text{HWE}^5\text{CitGC}^8\text{RLVC}^{12}\text{K}^{13}$ **32**, die sowohl C- als auch N-terminal ein L-Lysin trägt, wurden ergänzend synthetisiert. Beide Spezies dimerisierten während der Luftoxidation in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer (genauso wie das zuvor erwähnte **28d-Ahx**). Das Monomer wurde nicht beobachtet. Die thiolreiche Struktur kann also N- und C-terminal verlängert werden, ohne ihre Dimerisierungspräferenz einzubüßen (siehe in diesem Zusammenhang auch

Kapitel 3.8.7 und anschließend Kapitel 3.9). In Abbildung 3.52 ist der Einfluss der Verlängerung auf den *hinge* schematisch gezeigt: Durch den *twist* der beiden *hairpin*-Untereinheiten des Dimers verlaufen die jeweiligen verlängerten β -sheets aneinander vorbei.

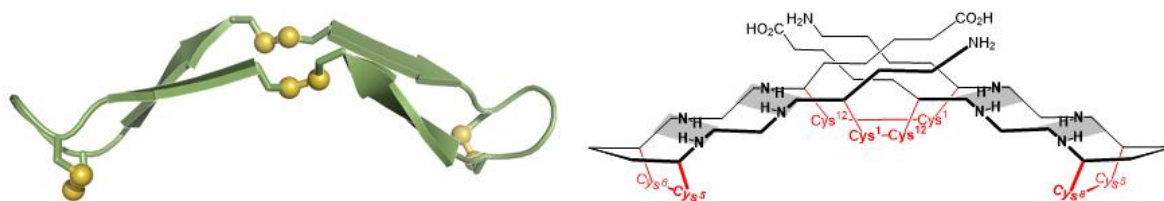


Abbildung 3.52. Die NMR-Struktur des antiparallelen *hinges* als Cartoon-Darstellung (links) verdeutlicht den *twist* der monomeren *hairpin*-Untereinheiten. Für eine Verlängerung der Termini hat dies zur Folge, dass die resultierenden *sheets* aneinander vorbeilaufen (schematisch rechts).

Bei näherer Betrachtung der kompakten *hinge*-Struktur (Abbildung 3.46 und 3.52) wird deutlich, dass sich die terminalen Enden und damit auch die zusätzlich addierten Aminosäuren und deren Seitenketten räumlich nahekomen. Diese Eigenschaft könnte ausgenutzt werden, um andere Moleküle oder Ionen mit den geeigneten Funktionalitäten zu binden. Anstelle von terminalen Lysinen wurde der Einbau von L-Tyrosin in Anlehnung an eisenbindende Catecholamine wie L-DOPA überprüft. So wurde Peptiddimer **33d** mit N-terminalem Tyrosin synthetisiert. Die Variante **34** mit C-terminalem Tyrosin führte unerwarteterweise in geringen Ausbeuten zum Monomer **34m** (eine nähere Betrachtung dieser Spezies findet sich im folgenden Kapitel 3.8.6.1 wieder).

Die Synthese und Isolation eines Peptids, das Tyrosin sowohl N- als auch C-terminal enthält ($\text{Y}^0\text{C}^1\text{HWE}^5\text{CitGC}^8\text{RLVC}^{12}\text{Y}^{13}$), gelang aufgrund von sehr schlechter Löslichkeit im Oxidationspuffer nicht. Geringe Anteile an monomerer Spezies nach Luftoxidation konnten massenspektrometrisch nachgewiesen werden, das dimere Tetradisulfid jedoch nicht.

3.8.6.1 Das 13er-Bidisulfid-Monomer

Die Oxidation der Sequenz $\text{C}^1\text{HWE}^5\text{CitGC}^8\text{RLVC}^{12}\text{Y}^{13}$ **34** erwies sich als schwierig, da das Tetrathiol schlecht in der basischen Ammoniumcarbonatlösung löslich war und die Luftoxidation erst unter Zusatz von H_2O_2 startete. Es konnten ausreichende Mengen (0.9 mg aus etwa 150 mg Roh-Oxidationsprodukt) für ein ^1H -NMR-Spektrum sowie die Sequenzierung isoliert werden. Die Oxidation zum Monomer erwies sich in weiteren Syntheseansätzen jedoch als nicht reproduzierbar. Abbildung 3.53 stellt den amidischen Bereich des ^1H -NMR-

Spektrums von Bidisulfid **34m**, denjenigen des Tetradisulfid-Dimers **28d** (C5,C8) und denjenigen des Monodisulfid-Monomers **24m** (S5,S8) gegenüber. Prinzipiell ist im Vergleich zwischen monomerer und dimerer Spezies all das zu beobachten, was auch für die sonstigen Monomer-Dimer-Paare festgestellt wurde (siehe Kapitel 3.8.1). Die Amidsignale im Monomer sind im Vergleich zum Dimer fast alle hochfeldverschoben. Beim Vergleich zwischen dem Bidisulfid-Monomer **34m** (C5,C8, pH 4.4) und dem Monodisulfid-Monomer **24m** (S5,S8, pH = 3.0) ist der unterschiedliche pH-Wert zu berücksichtigen, der sich im Besonderen auf nicht-Wasserstoffbrücken-gebundene NHs auswirkt. Die Unterschiede sind in Nachbarschaft zum zentralen Disulfid am größten. C5-NH und C8-NH sind besonders weit hochfeldverschoben, das Gleiche gilt in **24m** nur für das in *i*+3-Position befindliche S8, stattdessen wird außerdem R9-NH noch weiter im Hochfeld gefunden. Prinzipiell sind aber die gleichen Verschiebung-Tendenzen zu erkennen, die für die verschiedenen Spezies in Kapitel 8.3.1 diskutiert wurden und lassen auf eine ähnliche, wenn auch durch das zweite Disulfid eingeschränkere Konformation von **34m** schließen.

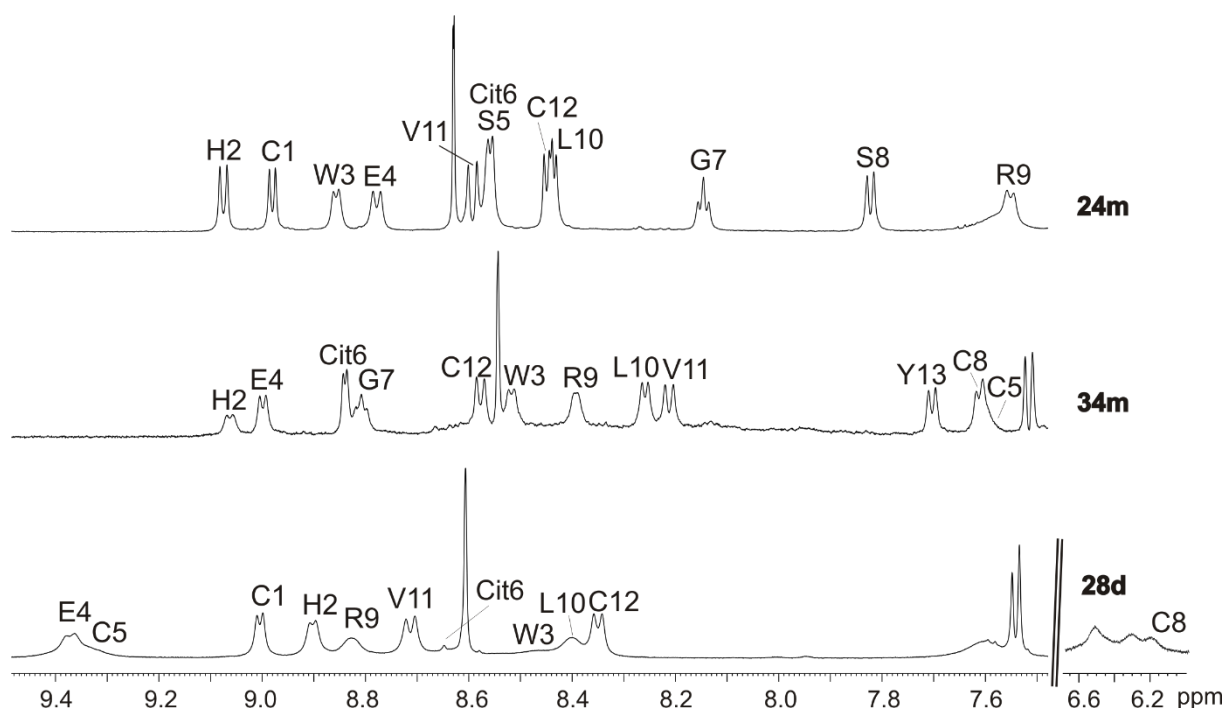


Abbildung 3.53. Amidregionen der ^1H -NMR-Spektren von Bidisulfid-Monomer **34m** (Mitte) im Vergleich zu Monodisulfid-Monomer **24m** und Tetradisulfid-Dimer **28d** (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O 9:1; pH 4.4 für **34m**, pH = 3.0 für **28d** und **24m**).

3.8.7 Variation des *turns* im 12er-*hairpin*

Citrullin in *i+1*-Position des *turns* ist keine der proteinogenen Aminosäuren, dafür aber das isostere Arginin, aus dem Citrullin im Organismus gebildet wird (siehe Einleitung 1.4). Für mögliche proteinchemische Anwendungen des Tetradisulfid-Motivs, bspw. als *de novo*-Domäne in einer Proteinsynthese, wurde deshalb überprüft, ob bei einer Mutation Cit6→Arg die verlässliche Dimerisierung erhalten bleibt und die Sequenz damit kodierbar ist. Peptid **35d** bestätigt dies (analytische Daten im experimentellen Teil) und ein Einbau des antiparallelen *hinges* in größere Proteinstrukturen, in denen es als verlässliche, kovalente Dimerisierungsdomäne dienen könnte, steht nichts im Weg (vgl. auch Kapitel 3.9). In diesem Zusammenhang ist auch die Möglichkeit der N- und C-terminalen Verlängerung des Motivs unerlässlich, welche in Kapitel 3.8.6 bereits bestätigt wurde.

Die *turns* der bisherigen 12er-*hairpins* wurden vor allem in *i*- und *i+3*-Position variiert. Daher wurde ein mit dem Strukturmotiv nicht verwandter *turn* ausgewählt und eingebaut, der aus dem disulfidreichen und für oxidative Faltungsprozesse schon häufig untersuchten Peptid BPTI (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*) stammt.^[180,181,321] Es besteht aus 58 Aminosäuren mit einem zentralen β -*hairpin*, der den Sequenzabschnitt 18-35, also 18 Aminosäuren, umfasst. Der *turn* wird von den vier Aminosäuren 25-28 gebildet, nämlich -AKAG-. Diese vier Aminosäuren wurden dementsprechend an den hydrophoben Cluster (CHWE-*turn*-RLVC) addiert (Abbildung 3.54, oben). Für diese Sequenz K⁰C¹HWEA⁵KAG⁸RLVC¹² **36** konnte ausschließlich das Monomer **36m** isoliert werden.

Der Amidbereich des ¹H-NMR-Spektrums des zugehörigen Peptids **36m** ist in Abbildung 3.54, unten, dargestellt. Es zeigt eine sehr hohe Dispersion und sonst alle Eigenschaften, die die anderen Monomere **23-Ahx-m**, **24m** und **34m** aufweisen. Die Hochfeldverschiebung der NH-Protonen Aminosäuren E4-A5-K6-A7-A8-R9 ist in diesem Fall noch extremer. R9-NH stellt das hochfeldigste Amidsignal dar und liegt für **36m** sogar bei außergewöhnlichen 6.55 ppm (**23-Ahx-m**: 7.30 ppm, **24m**: 7.55 ppm, **34m**: 8.40 ppm). Die helikale Anordnung des *bulge turns* ist also noch ausgeprägter als bei den anderen monomeren Derivaten. Allein damit lässt sich allerdings nicht erklären, warum es zu keiner Dimerisierung der Peptidsequenz **36** kommt, denn für **21** würde in diesem Fall ebenfalls eine hauptsächliche Monomerbildung erwartet, es wird aber nur das Dimer erhalten. Erst die Manipulation des N-Terminus mit Ahx führt zur Monomerisierung, dabei wird jedoch der *turn* nicht beeinflusst. **24** dagegen bildet ein Gemisch aus monomerer und dimerer Form, weist aber eine geringere Hochfeldverschiebung als **23-Ahx-m** auf. Auch die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der *turn*-Aminosäuren und ihre Seitenketten haben einen entsprechenden Einfluss auf die Verschiebung.

Im Besonderen ist Alanin Helix-begünstigend. Das Monomer **36m** scheint jedenfalls energetisch so günstig zu sein, dass eine Dimerisierung keinen thermodynamischen Vorteil mit sich bringt. Auch hier könnte die Dynamik der monomeren Untereinheiten, die in komplementärer Bewegung zum zweifachen *hairpin* reagieren, das unterschiedliche Verhalten erklären. Die *turn*-Region spielt dabei eine entscheidende Rolle für diese globale, korrelierte Beweglichkeit der *hairpins* insgesamt und ermöglicht oder verhindert eine intermolekulare Dimerisierung über die terminalen Cysteine.

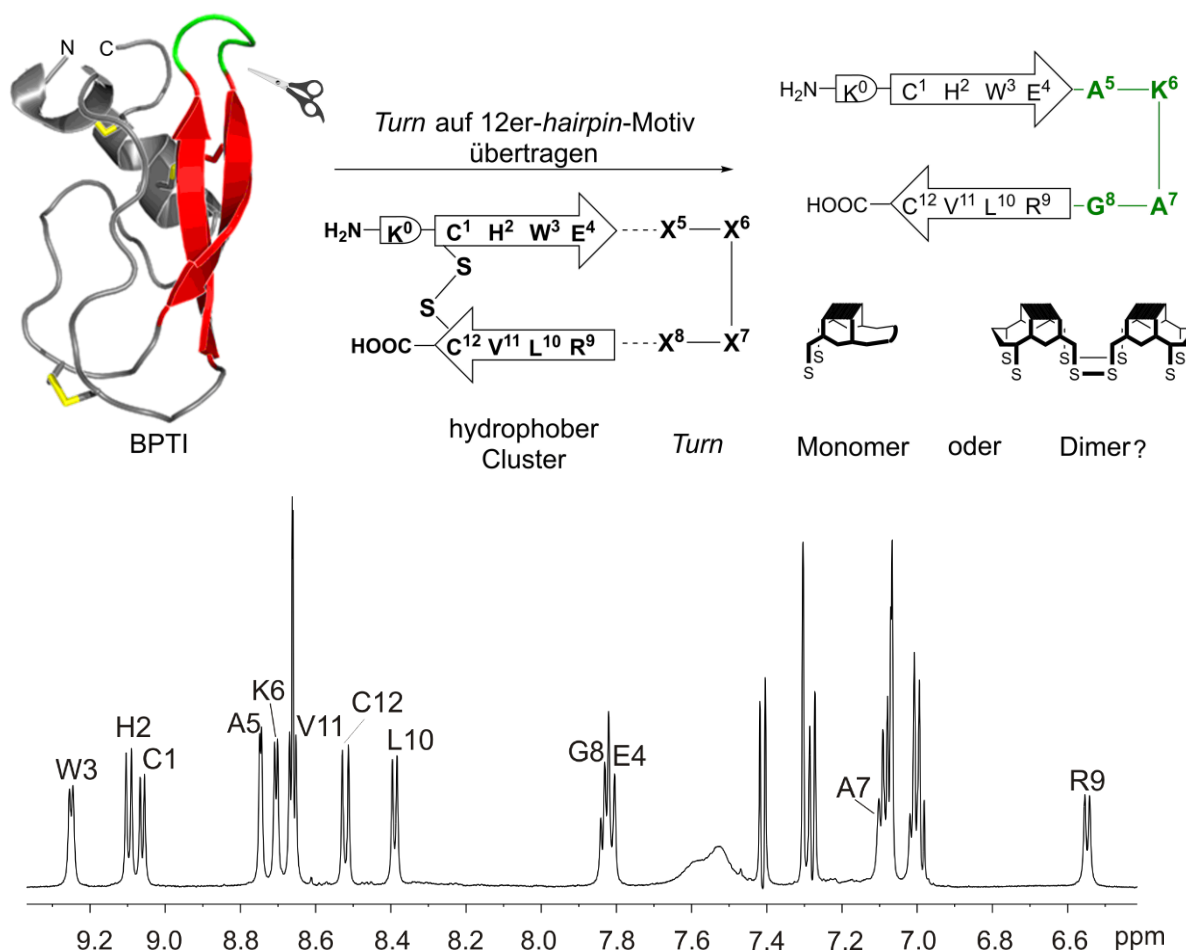


Abbildung 3.54. Oben: Der Einfluss des *turns* auf die Monomerisierungs- bzw. Dimerisierungstendenz wird durch den Einbau einer *turn*-Sequenz aus einem anderen, bekannten β -*hairpin*-Motiv, in diesem Fall aus BPTI (links, PDB: 1CBW),^[322] untersucht. Rot: β -*sheets*, grün: *turn*, gelb: Disulfide, grau: sonstige Domänen des BTPI. Unten: Amidregion des ^1H -NMR-Spektrums des zugehörigen Peptidmonomers **36m** (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Die Übertragung eines biologisch relevanten *turns* auf das 12er-*hairpin*-Motiv ist also möglich und führt zu einer, in diesem Fall, monomeren Vorzugskonformation. Die Erforschung weiterer *turn*-Typen und -Sequenzen wird Aufschluss darüber geben, welche konformationellen und chemisch-funktionellen Bedingungen für eine Dimerisierung über die terminalen Thiole notwendig sind.

3.9 Das Tetradisulfid als Dimerisierungsdomäne in Proteinstrukturen

Das bisherige Peptiddesign legt *top down*-Ansätze zugrunde, aus denen das Tetradisulfid-Dimer **28d** hervorging. Dieses stellt mit zwei intermolekularen Disulfidbrücken in seinen räumlichen Eigenschaften ein antiparalleles (N- und C-Termini sind untereinander verknüpft) Scharnier, englisch *hinge*, dar (siehe Kapitel 3.8). Eine sogenannte *hinge*-Region existiert auch in Antikörpern (siehe auch Einleitung 1.7), in diesem Fall mit paralleler Ausrichtung (N- bzw. C-Termini sind jeweils mit sich selbst verknüpft, also parallel zueinander angeordnet).^[207] Aus diesem Wissen entstand die Idee, das neu entwickelte, kodierbare Dimerisierungsmotiv **35d** ($K^0C^1HWE CRGCRLVC^{12}$) in einem *bottom up*-Prozess in größere Proteinstrukturen einzubringen und somit *de novo*-Proteinstrukturen zu kreieren. Dies käme aus der Sicht des Peptids einer N- bzw. C-terminalen Verlängerung der antiparallelen *hinge*-Sequenz gleich (vgl. Kapitel 3.8.6).

Dabei gibt es die Möglichkeit, den antiparallelen *hinge* C- oder N-terminal sowie intern in eine Proteinsequenz zur Dimerisierung einzubauen (schematisch in Abbildung 3.55). Wenn die 12er-Sequenz sowohl C- als auch N-terminal angebracht wird, können Oligomerisierungen eintreten. In diesem Fall ist die Bildung eines intramolekularen *hinge*-Protein-Monomers ebenfalls möglich. Proteindimere und -oligomere, sowohl kovalent verknüpft (bspw. Antikörper) als auch im nicht-kovalenten, dynamischen Gleichgewicht, spielen eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen und damit auch in der Evolution von Proteinen und deren Funktion.^[323–325] Die verlässliche, regioselektive und antiparallele Dimerisierungseinheit, bestehend aus 2 mal 12 Aminosäuren (CHWE CRGCRLVC), könnte derartige Dimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsprozesse einerseits gezielt zugänglich machen, andererseits vollkommen neue Struktur motive ermöglichen. Die generelle Eignung dieses Struktur motifs für das Proteindesign sollte im Folgenden festgestellt werden.

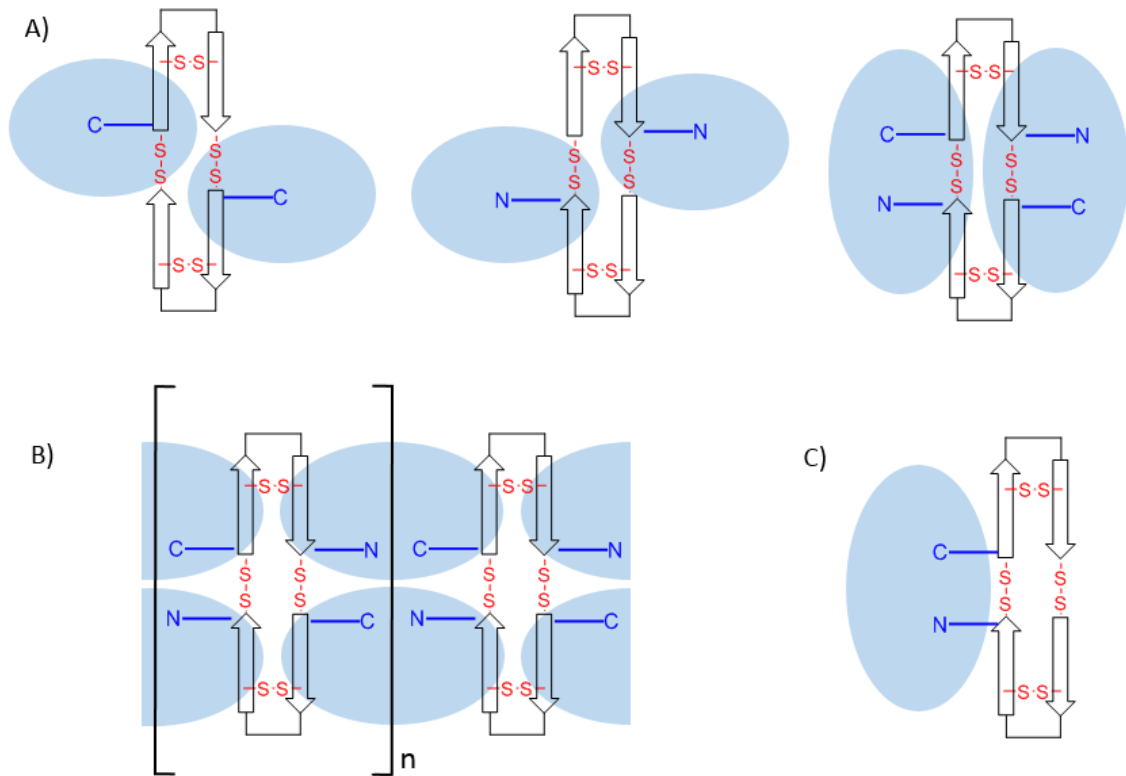


Abbildung 3.55. Schematische Darstellung des Einbaus der *de novo* entwickelten Dimerisierungsdomäne in Proteine (vereinfacht als blaue Ellipsen). Oben (A) sind drei Möglichkeiten der Dimerisierung unter der strukturellen Voraussetzung einer C₂-symmetrischen Anordnung des Proteins gezeigt, darunter (B) die potentielle Oligomerisierung für den Fall, dass zwei *hinge*-Peptide an gegenüberliegenden Proteinenden positioniert sind. Unter diesen Umständen können auch Monomere (C) entstehen.

3.9.1 LEH-Dimere

Der erste Ansatz zur Implementierung der Dimerisierungssequenz erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von MANFRED REETZ (Marburg, Fachbereich Chemie). Diese verwendet die Limonen-1,2-epoxidhydrolase (LEH) in Experimenten zu gerichteter Evolution, wobei sie die Enantioselektivität (als Substrat wurde Cyclohexenoxid verwendet), Thermostabilität und Aktivität dieses Enzyms optimieren.^[326,327] Die aktive Spezies ist ein nicht-kovalentes Enzymdimer.^[328] Eine entsprechende Kristallstruktur, dargestellt in Abbildung 3.56, zeigt an, dass sich dabei die C-Termini der monomeren Protein-Untereinheiten räumlich sehr nahekomen, während die N-Termini in unterschiedliche räumliche Richtungen divergieren. In Anlehnung an das schematische Design aus Abbildung 3.55 wurde also der Entschluss gefasst, die 13er-Sequenz KCHWECRGCLVC am C-Terminus des Peptids zu ergänzen. Ein weiterer Vorteil der LEH-Sequenz ist die Abwesenheit von Cysteinen im Wildtyp.

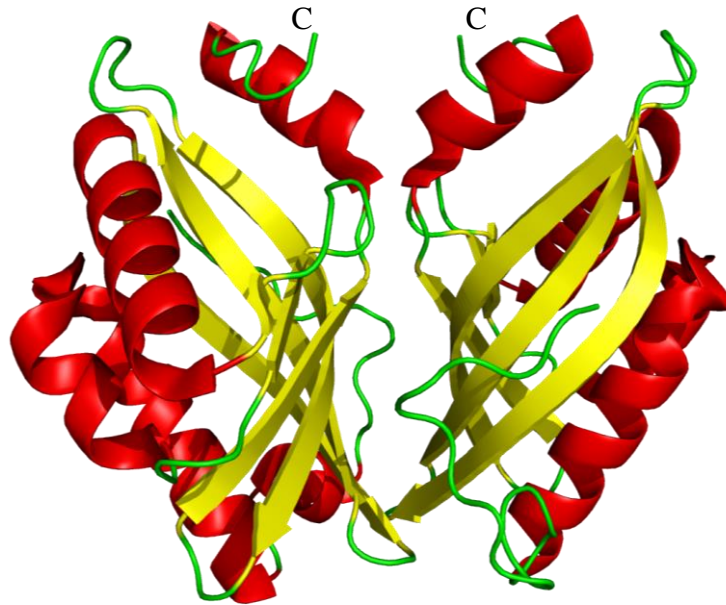


Abbildung 3.56. Kristallstruktur der LEH als Cartoon-Darstellung (pdb: 1NU3).^[328] Die C-terminalen Enden sind angezeigt.

Die Synthese erfolgte mittels rekombinanter Methoden in prokaryotischen Zellen (*E. Coli*) und wurde von der Firma GENSCRIPT (Piscataway, New Jersey, USA) durchgeführt. Es wurden zwei Sequenzen synthetisiert, wobei sie sich ausschließlich in der Anzahl an Glycinen unterscheiden, die die Dimerisierungsdomäne vom ursprünglichen Protein trennt. N-terminal wurde ein His-Tag für Proteinanalysen und -reinigungen angefügt.

Die Sequenzen lauten (rot: LEH Wildtyp, grün: *Spacer*, blau: Dimerisierungssequenz):

- **Proteinsequenz 1:**

MHHHHHHTSKIEQPRWASKDSAAGAASTPDEKIVLEFMDALTSNDAAKLIEY
FAEDTMYQNMPLPPAYGRDAVEQTLAGLFTVMSIDAVETFHIGSSNGLVYTE
RVDVLRALPTGKSYNLSILGVFQLTEGKITGWRDYFDLREFEEAVDLPLRGGG
KCHWECRGCRLVC (LEH1)

- **Proteinsequenz 2:**

MHHHHHHTSKIEQPRWASKDSAAGAASTPDEKIVLEFMDALTSNDAAKLIEY
FAEDTMYQNMPLPPAYGRDAVEQTLAGLFTVMSIDAVETFHIGSSNGLVYTE
RVDVLRALPTGKSYNLSILGVFQLTEGKITGWRDYFDLREFEEAVDLPLRGGG
GGKCHWECRGCRLVC (LEH2)

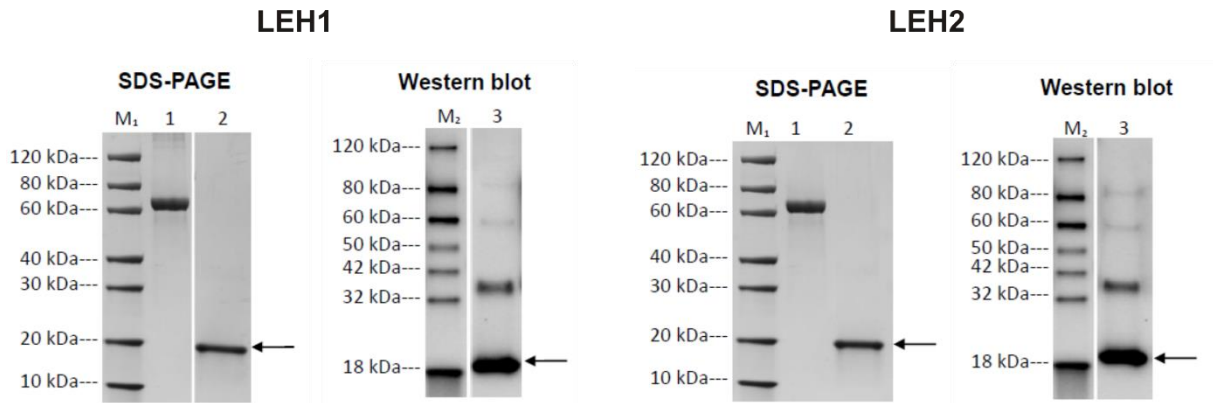


Abbildung 3.57. SDS-Page- (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) und Western Blot-Analyse der Proteinsequenzen **LEH1** und **LEH2**. Die Pfeile kennzeichnen dabei die monomeren Proteinspezies. In den Western Blots sind darüber hinaus auch noch deutliche Banden für die zugehörigen Dimere sichtbar. Spur M1 und M2 enthalten jeweils Proteinmarker mit definierter Molmasse der Firma GENSCRIPT. Spur 1 ist mit BSA (*Bovine Serum Albumin*) als bekannte Referenz belegt, die Spuren 2 und 3 enthalten die jeweiligen synthetisierten Proteine. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler anti-His-Antikörper verwendet.

Zur Reinigung wurde eine einmalige Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (Nickel-Säule) von GENSCRIPT ausgeführt. Die Reinheit und Konstitution der Proteine wurde vorerst mit SDS-Pages und Western Blots jeweils unter reduzierenden Bedingungen bestimmt (Abbildung 3.57). Im Western Blot wurde zwar unter denaturierenden Bedingungen gemessen, trotzdem existiert eine eindeutig sichtbare Bande der dimeren Spezies. Dies könnte somit ein Hinweis auf eine hohe Dimerisierungstendenz und Stabilität der Disulfide sein.

Höhere Auflösungen und damit detailliertere Informationen konnten durch Massenspektrometrie erhalten werden. Diese sind für beide LEH-Mutanten im Anhang (Kapitel 8.10) einzusehen und beweisen das Vorliegen der vollständig oxidierten (vier Disulfide), dimeren Spezies. Dabei stellte sich jedoch die Frage, ob die LEH-Mutanten über die Disulfide intermolekular-kovalent verknüpft vorliegen, oder ob sie nicht-kovalente Dimere mit intramolekularen Disulfiden bilden. In Abbildung 3.58 ist das Massenspektrum einer nativen Messung von **LEH2** (links) und unter reduzierenden Bedingungen mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP, rechts) gezeigt. Der Vergleich der Ladungsmuster in Bezug auf die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) und aus den daraus errechneten Proteinmassen zeigt, dass unter nativen Bedingungen eine intermolekulare Disulfidverknüpfung vorliegt und dementsprechend fast ausschließlich das kovalente Dimer (38284 g/mol) vorliegt. TCEP reduziert (offenbar selektiv) die intermolekulare Disulfidbrücke, sodass der detektierte

Massenpeak demjenigen des einfach intramolekular disulfidverbrückten Monomers (19144 g/mol; die vollständig reduzierte Spezies besitzt eine Masse von 19142 g/mol) entspricht.

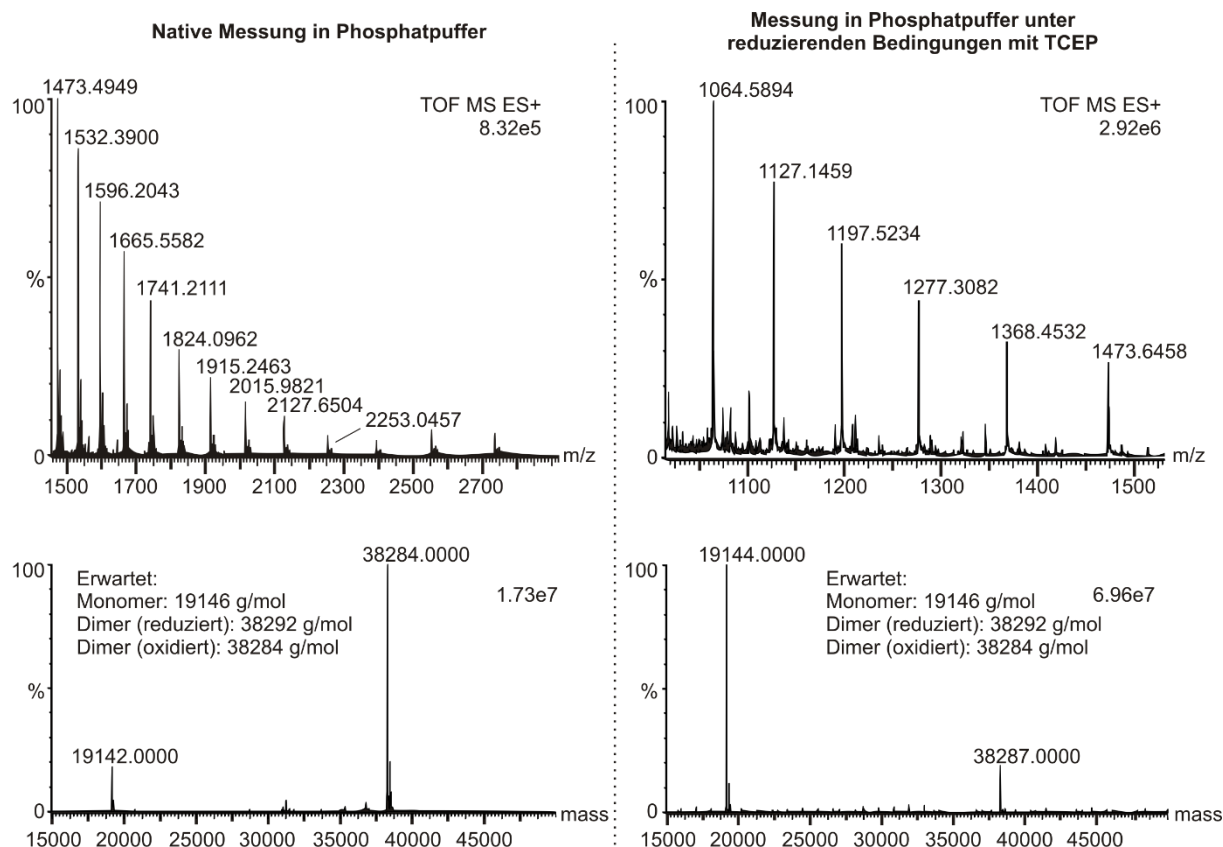


Abbildung 3.58. Massenspektren (TOF MS ES+) der Proteinsequenz **LEH2**. Oben sind die tatsächlich gemessenen Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) abgebildet, darunter die daraus berechneten Proteinmassen ($mass$). Links ist das Massenspektrum unter nativen Bedingungen zu sehen, bei dem fast ausschließlich das Dimer beobachtet wird. Setzt man TCEP als Reduktionsmittel zu (rechts), verschiebt sich das Verhältnis zu Gunsten der monomeren Spezies.

DR. AITAO LI, Mitglied des Arbeitskreises REETZ, führte anschließend noch funktionale Untersuchungen zusammen mit dem Wildtyp durch, wobei das bereits in den zugehörigen Publikationen veröffentlichte Cyclohexenoxid als Substrat zum Einsatz kam.^[326,327] Dabei zeigten die synthetisierten Dimere mit dem C-terminal addierten antiparallelen *hinge* keine Veränderung der Aktivität oder der Enantioselektivität (der Wildtyp zeigt einen Umsatz von >99% und 4% Enantiomerenüberschuss).

Erste Kristallisationsexperimente unter literaturbekannten Bedingungen^[328] wurden begonnen, wobei Resultate noch ausstehen. Isolierte β -*hairpin*-Peptide lassen sich durch ihre inhärente Dynamik nur schwer aus einer Lösung kristallisieren. Die Kristallisation einer dimeren *hairpin*-

Domäne im Proteinkontext würde somit auch detaillierte strukturelle Informationen über das Peptid selbst ergeben.

Die rekombinante Synthese von LEH-Dimeren mit antiparalleler *hinge*-Domäne wurde durchgeführt, SDS-Pages, Western Blots und Massenspektren lieferten Beweise für die korrekte Konstitution des vollständig oxidierten Proteins. Ein absoluter Strukturbeweis, der genaue Informationen über die (intermolekulare) Topologie der Disulfidverknüpfungen liefert, steht allerdings noch aus, ausschließlich das Dimer beobachtet wird. Setzt man TCEP als Reduktionsmittel zu (rechts), verschiebt sich das Verhältnis zu Gunsten der monomeren Spezies.

Eine antiparallele *hinge*-Region in Antikörpern

Zwischen dem etwa 20 kDa schweren Enzym LEH ohne eigene Cysteine (Kapitel 3.9.1) und einem etwa 150 kDa schweren Antikörper, der sich aus leichten und schweren Ketten mit vielen sequentiellen Cysteinen zusammensetzt, besteht ein signifikanter Komplexitätsunterschied. In einem IgG1-Antikörper gibt es jenseits der *hinge*-Region 28 Cysteine, aus denen zwei intermolekulare und zwölf intramolekulare Disulfide gebildet werden. Der Einbau eines antiparallelen *hinge*-Dimers mit acht weiteren Cysteinen in zentraler Position (vergleiche Abbildung 3.55) stellt damit eine extrem hohe Herausforderung an die Regioselektivität der gleichzeitigen Faltung aller Antikörperdomänen. Dabei stellt sich die Frage, was ein antiparalleler *hinge* überhaupt für einen Einfluss auf ein Immunglobulin in Bezug auf dessen Struktur und biologische Aktivität hat. Die *hinge*-Region eines Antikörpers hat jenseits der Verknüpfung von Fc- und Fab-Fragmenten wichtige Funktionen bei der Komplementaktivierung und damit der biologischen Funktion eines jeden Immunglobulins.^[226,227]

Abbildung 3.59 verdeutlicht schematisch den strukturellen Unterschied zwischen Antikörper mit parallelem (links) bzw. mit antiparallelem (rechts) *hinge*. Die entscheidende Rolle spielt dabei die relative Ausrichtung der Fab-Arme untereinander sowie relativ zur Fc-Region. Durch eine antiparallele Verknüpfung wird der Fab-Teil um 90° relativ zum Fc-Part gedreht, wodurch sich die Position der Fab-Arme vertauscht (in den zweidimensionalen Darstellungen ist nicht zu erkennen, dass Fab- und Fc-Regionen im dreidimensionalen Raum senkrecht aufeinander stehen). Prinzipiell wird die Beschaffenheit der Antigen-bindenden Domänen also nicht angetastet, sondern nur deren relative räumliche Positionierung verändert. Ob dies, neben der Beeinflussung der Dynamik des Systems, bei einem symmetrischen Immunglobulin-Dimer einen Einfluss auf die biologische Aktivität hat, wird in Funktionsassays überprüft.

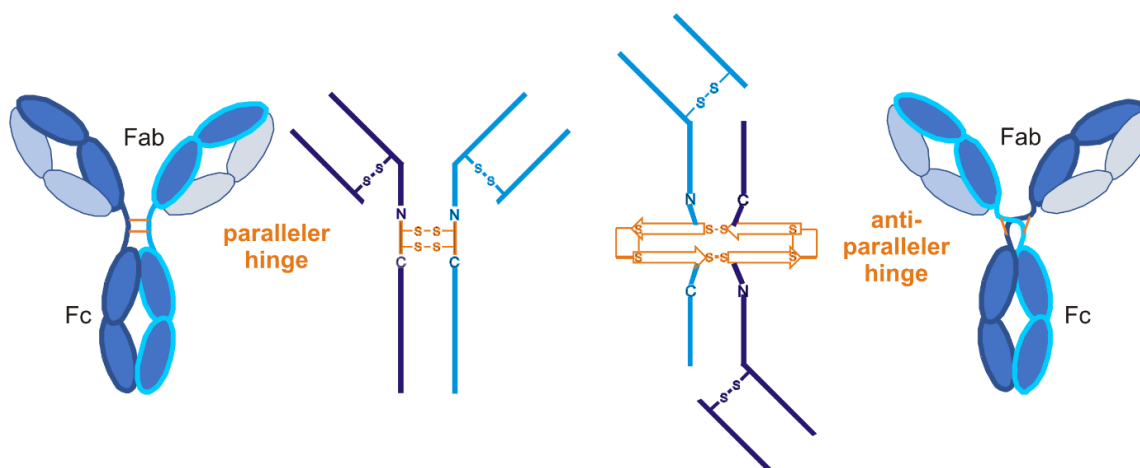


Abbildung 3.59. Schematische Darstellung des strukturellen Unterschieds zwischen Antikörper mit parallelem *hinge* (links) und antiparallelem *hinge* (rechts). Die relative Ausrichtung der Fab-Arme untereinander und zur Fc-Region verändern sich beim Einbau der antiparallelen Dimerisierungseinheit.

Die parallele *hinge*-Region eines Antikörpers besteht aus dem *upper*, *middle* und *lower hinge* (siehe Kapitel 1.7.1). Dementsprechend stellte sich die Frage, welcher dieser Sequenzabschnitte substituiert werden sollte, wobei sich für den zentralen *hinge* mit dem CPPC-Motiv, über das die intermolekulare Dimerisierung abläuft, entschieden wurde. An dessen Stelle trat die antiparallele *hinge*-Sequenz mit sowohl N- als auch C-terminalem Lysin (KCHWECRGRLVCK). Die Proteinsequenz entspricht derjenigen der leichten und schweren Kette (letztere enthält den *hinge*) des monoklonalen IgG1/ κ -Antikörpers CL4mAb (GenBank-Nummern: JF970211 [leichte Kette], JF970210 [schwere Kette]). Sie wurde in das Plasmid pPha-DUAL[2xNR] (GenBank-Nummer: JN180664) geklont, das zwei Polylinker (*multiple cloning sites*) unter der Kontrolle des Nitratreduktase-Promoter/-Terminator-Systems von *Phaeodactylum tricornutum* enthält.^[329] Alle Sequenzen der schweren und leichten Ketten mit und ohne unnatürlicher Dimerisierungssequenz sind im Anhang (Kapitel 8.11) einzusehen wurden zum direkten Vergleich synthetisiert.

Die rekombinante Synthese erfolgte durch FRANZISKA HEMPEL im Arbeitskreis MAIER (Marburg, Fachbereich Biologie) nach bereits publizierten Methoden in eukaryotischen Zellen, nämlich *Phaeodactylum tricornutum*, einer Kieselalge (Diatomee).^[329–331] Plasmide, die die relevanten Antikörpersequenzen codiert, wurde per Genkanone in die Algenzellen eingebracht, sodass die ringförmige DNA die Zellwände durchdringt und dauerhaft in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird. Man spricht in diesem Fall auch von einer stabilen Transfektion.

Erste Western Blots des Diatomeen-Überstandes unter reduzierenden Bedingungen, die FRANZISKA HEMPEL durchführte, identifizierten sowohl schwere als auch leichte Ketten im Medium (siehe Anhang 8.12). Durch die bereits publizierten Ergebnisse der Arbeitsgruppe

MAIER war bereits bekannt, dass neben der leichten Kette nur der vollständig assemblierte Antikörper (also keine isolierten schweren Ketten) von den Algen sezerniert wird.^[329,331] Damit war der erste indirekte Hinweis vorhanden, dass der Antikörper mit dem antiparallelen *hinge* auch tatsächlich vollständig zusammengesetzt vorlag. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnte im Western Blot dann auch eine Bande für das dimere Immunglobulin beobachtet werden (Anhang 8.12).

Weiterhin wurden von FRANZISKA HEMPEL auch vorläufige ELISA-Tests mit den Proteinen direkt aus dem Überstand durchgeführt (Anhang 8.12). Als Antigen diente dabei das Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen (engl. *hepatitis B virus surface antigen*, kurz HBsAg, Subtyp adr der Firma *Abcam*).^[331] Dabei stellte sich heraus, dass die *hinge*-mutierten Antikörper ihre Antigen-bindenden Eigenschaften nicht verlieren (für eine genaue Quantifizierung sind weitere Reinigungsschritte und ELISA-Tests vonnöten). Zumindest die Bindungsaffinität im ELISA wird also durch den antiparallelen *hinge* nicht eingeschränkt. Aussagen über den Einfluss auf die räumliche Struktur und die Dynamik des Antikörpers können auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht getroffen werden. Jedenfalls weisen die genannten Analysen darauf hin, dass der Antikörper korrekt verknüpft als intermolekulares Disulfid-Dimer vorliegen muss. In diesen Experimenten wurde der *proof-of-concept* erbracht, dass eine Peptidsequenz, die auf eine verlässliche, antiparallele Dimerisierung über Disulfide mit hoher Regioselektivität optimiert wurde, als neue Domäne in größere Proteine eingebracht werden kann. Selbst Antikörper mit vielen eigenen Thiolen bilden regioselektiv biologisch funktionelle Dimere. Folglich eröffnet sich ein neuer Weg, der von der *top down*-Strategie in Richtung RA-Peptidepitope und deren Optimierung zu rekombinanten *bottom up*-Synthesen von Proteinen mit unnatürlichen Peptiddomänen führt. Der antiparallele *hinge* kann in Zukunft eingesetzt werden, um Proteine, im Besonderen in Anwesenheit von weiteren Cysteinen, verlässlich kovalent zu dimerisieren.

3.10 Die Rolle des Tryptophans im hydrophoben Cluster

Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, kommt dem Tryptophan in Position 3 des β -*hairpins* eine besondere Rolle innerhalb des hydrophoben Clusters in Bezug auf dessen Stabilität zu. Der unsymmetrische Indol-Heteroaromat bietet eine Kontaktfläche für das gegenüberliegende Leucin in Position 12 und zeigt eine definierte Ausrichtung auf der Unterseite der β -*hairpin*-Ebene, wiedergegeben durch charakteristische NOE-Kontakte. Abbildung 3.10 in Kapitel 3.3.2 zeigt diese Kontakte und Ausrichtung für Referenzepitop 1. Völlig neue Indolmotive wurden

für die verschiedenen D-Aminosäure-haltigen Epitope, die Bidisulfide, Kombinationen dieser Designelemente und im Besonderen auch das Tetradisulfid-Dimer erhalten, wie in den verschiedenen CD- als auch vor allem in den NMR-Spektren gesehen.

Abbildung 3.60 zeigt die Tryptophan-Seitenkette sowie alle beobachteten NOE-Seitenketten verschiedener Peptidepitope im Vergleich zum all-L-Epitop **1**. Die Vielzahl an Mustern der räumlichen Kontakte ist direkt ersichtlich. Das Doppel-D-Peptid **10** (t6,r9) zeigt keine Veränderungen: Der Pyrrol-Teil des Indols ist zum L12 und H2 (Indol-H2) orientiert, der Benzolring zeigt Kontakte zu den gegenüberliegenden L12, R11, S10 sowie mit Indol-H4 zum benachbarten E4-NH. Die korrelierte D-Mutation t6/r9 verändert also die Beschaffenheit des hydrophoben Clusters nicht, wie bereits in Kapitel 3.5 beschrieben. Anders verhält es sich mit der Doppel-D-Mutation der nachfolgenden Aminosäuren s5 und s10 in Peptid **12**. Der Heteroaromat orientiert sich in diesem Fall so, dass das Indol-H2 und das Indol-NH in Richtung der Aminosäuren auf dem eigenen β -Strang, nämlich s5-NH und T6-NH, orientiert sind, während die aromatischen Protonen des Benzolrings zu den gegenüberliegenden s10, R11 und L12 zeigen. Das gleiche Bild ergibt sich für die Bidisulfide **21** (C1-C14, c5-c10) und **22** (c1-c14,c5-c10), die also ebenfalls D-Aminosäuren in den Positionen 5 und 10 enthalten. Die zusätzliche Disulfidbrücke macht die Peptide noch rigider, wobei in diesem Fall noch mehr definierte NOE-Kontakte beobachtbar sind.

Tetra-D-Peptid **14** (t6,r9,s5,s10) zeigt wenige Kontakte, die aber darauf hinweisen, dass die Indol-Protonen 4, 5, 6 und 7 in Richtung R11 und L12 ausgerichtet sind. Von besonderer Interesse sind außerdem die 12er-*hairpin*-Epitope, die je nach *turn*-Sequenz Monomere oder Dimere, im Besonderen auch das Tetradisulfid-Dimer **28d**, bilden. Das 12er-Monomer **24m** (S5,S8) entspricht eher den Befunden der 14er-*hairpins*, die in Position 5 und 10 eine D-Aminosäure tragen. Dabei ist das Indol-NH in Richtung des eigenen β -Strangs orientiert, was durch den Kontakt zum S5-H β bestätigt wird. Der Benzolteil wiederum ist in Richtung des gegenüberliegenden Stranges, also S8, R9 und L10 positioniert. Beim zugehörigen Dimer **24d** (S5,S8) ist das Tryptophan dann wieder um den W3- χ 2-Winkel so gedreht, dass die Indol-Ausrichtung derjenigen des all-L-14er-Referenzepitops **1** entspricht. Diese Befunde gelten auch für das 12er-Monomer-Dimer-Paar **23** (T5,R8).

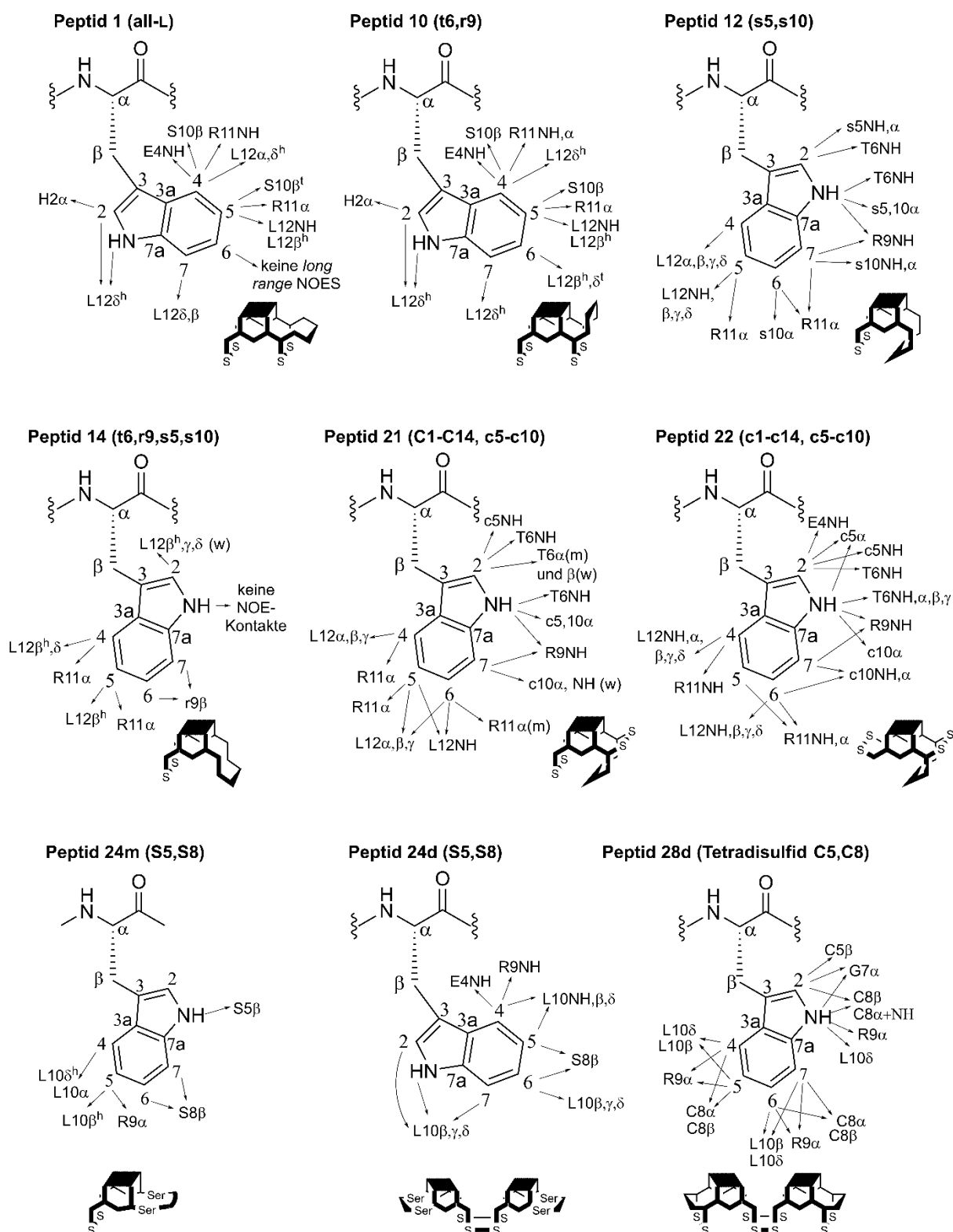


Abbildung 3.60. Beobachtete NOE-Kontakte der Tryptophan-Seitenkette verschiedener Peptidepitope und deren relative Ausrichtung (schematisch). Je nach Umgebung ergeben sich dafür unterschiedliche Möglichkeiten.

Interessanterweise werden für das Tetradisulfid-Dimer **28d** (C5,C8) gänzlich andere analytische Daten erhalten. Hier zeigt der Pyrrolteil des Heteroaromaten definierte Kontakte sowohl zum *turn* (C5, G7, C8) als auch zum gegenüberliegenden Strang mit NOE-Kreuzsignalen zu R9 und L10. Dieses Ergebnis könnte durch einen stetigen, festgelegten Wechsel um den $W3-\chi_2$ -Winkel hervorgerufen werden, sodass die beiden unsymmetrischen Hälften den Indols einmal zum *turn* und einmal in die *hairpin*-Mitte orientiert sind. Damit im Einklang stehen die ^1H -NMR-Daten des W3 in **28d**, die für die Indolsignale eine starke Verbreiterung durch konformationellen Austausch und teilweise eine starke Hochfeldverschiebung aufweisen (siehe Kapitel 3.8 und die experimentellen Daten der Tetradisulfid-Peptide). Die veränderten Muster in der W3-Seitenkettenorientierung scheinen dabei aber eher Symptome als Ursachen der veränderten Dynamik von Monomer und Dimer bzw. Bidisulfid- und Tetradisulfid-Dimer zu sein. Die ungewöhnliche β -*hairpin*-Periodizität und die komplementäre Beweglichkeit der Monomer-Untereinheiten als Dimerisierungsursache wirken sich somit direkt auf das W3 im hydrophoben Cluster aus, worauf die postulierte Scharnierbewegung sicherlich einen entscheidenden Einfluss besitzt.

Die verschiedenen Tryptophanmuster aller Peptidepitope stellen unter Beweis, wie vielschichtig die konformationellen Prozesse innerhalb des hydrophoben Clusters sind, von dem die Stabilität des β -*hairpins* hauptsächlich abhängt. Gerade wegen seiner hohen Formstabilität als Ausdruck der inhärenten *hairpin*-Dynamik ist er in der Lage, sich den jeweiligen konformationellen Gegebenheiten der veränderten Konfigurationen und zusätzlichen Disulfide anzupassen.

3.10.1 Fluoreszenzspektroskopie

Eine wertvolle Eigenschaft von Tryptophan ist dessen Fluoreszenz, die stark abhängig von dessen räumlicher Umgebung (Konformation des Proteins, Lösungsmittel) ist.^[332] Es wurden deshalb Fluoreszenzspektren von einigen ausgewählten Verbindungen in wässriger Lösung aufgenommen, nämlich von Referenzepitop **1**, Bidisulfid **19** (C1-C14,C5-C10), Doppel-D-Bidisulfid **21** (C1-C14,c5-c10) sowie Tetradisulfid-Dimer **28d** (detaillierte Messparameter im experimentellen Teil). In Abbildung 3.61 sind jeweils die für Tryptophan mögliche Anregungsbande bei 280 nm und die Emissionsbande bei 348 nm gezeigt. Nur für Referenzpeptid **1** ohne zweites, zentrales Disulfid im β -*hairpin* werden diese Banden beobachtet. Bei allen weiteren Peptiden, die in räumlicher Nähe zur Indol-Seitenkette eine zweite Disulfidbrücke besitzen, ist die Fluoreszenz gequencht. Allein der Wechsel von

Sauerstoff (L-Serin, Peptid **1**) zu Schwefel (L-Cystein, Peptid **19**) sorgt für den Verlust der Fluoreszenz-Emission. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete *Quenching*-Verhalten ist ein Energietransfer vom Tryptophan auf das zusätzliche Disulfid unter Bildung eines reaktiven, anionischen Disulfid-Radikals.^[333,334] Solche Prozesse sind für Disulfide in Proteinen bekannt, selbst dann, wenn die Indolseitenkette nicht in direkter räumlicher Nähe zum Disulfid positioniert ist.^[335] Die hier gemessenen Daten weisen auf ein solches Verhalten hin, wobei der Energietransfer Auch ein Wechsel zu D-Cysteinen (Peptid **21**), die die Schwefelatome zumindest räumlich weiter vom Tryptophan entfernen, ändert an dieser Tatsache nichts. Ungewöhnlich ist hier eine breite Emissionsbande mit einem Maximum bei 420 nm, allerdings mit einer sehr geringen Intensität. Beim Tetradisulfid-Dimer **28d** ist die Fluoreszenz vollständig gelöscht. Ein direkter Vergleich mit den anderen verwendeten Derivaten ist nicht ohne Weiteres möglich, da sich durch die *hinge*-Struktur des Dimers (vgl. Kapitel 3.8) die zwei Tryptophanseitenketten der Untereinheiten räumlich nahekomen, sodass ein Exciton-Coupling^[307,336] möglich ist (eine solche Eigenschaft zeigen bspw. die von COCHRAN *et al.* entwickelten *tryptophan zipper*-Peptide,^[47,337] bei denen sich zwei Paare von Trp-Indolen in räumlicher Nähe befinden und für eine hohe *hairpin*-Stabilität sorgen). interessanterweise nicht auf das terminale Disulfid (C1-C14) erfolgt, sondern nur auf das zentrale (C5-C10/c5-c10).

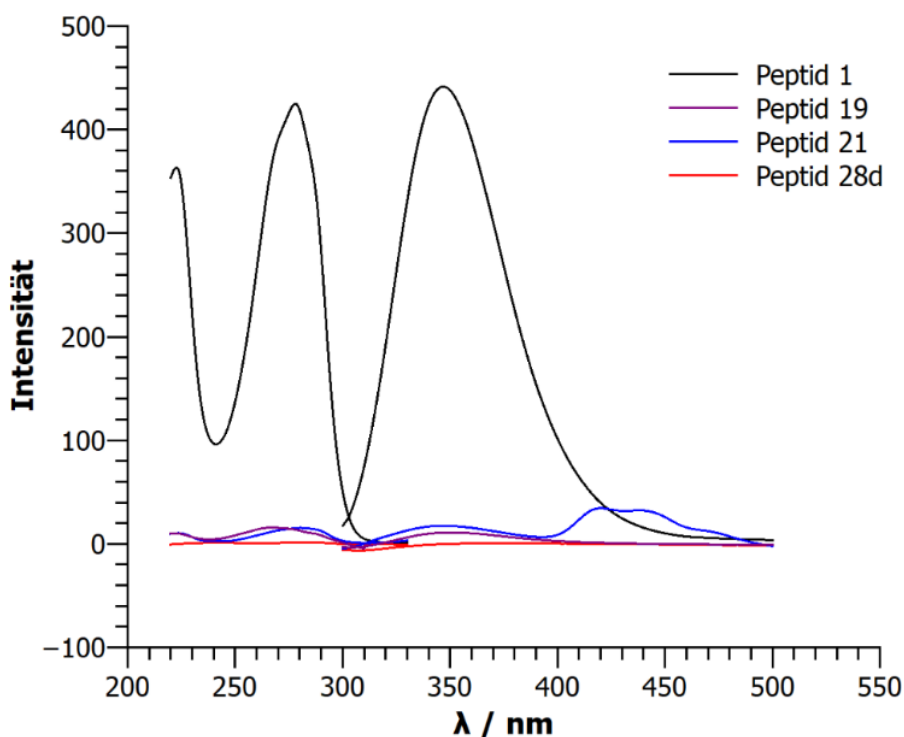


Abbildung 3.61. Fluoreszenzspektren der Peptide **1**, **19**, **21** und **28d** in wässriger Lösung ($c = 5 \mu\text{mol/L}$). Die Anregungswellenlänge des Tryptophans liegt bei 280 nm, die Emissionswellenlänge bei 348 nm.

Die aufgenommenen Fluoreszenzspektren bestätigen die starke Abhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz von dessen chemischer und konformationeller Umgebung, hier im Kontext des hydrophoben Clusters. Mit der Fluoreszenzspektroskopie steht also eine zusätzliche spektroskopische Methode zur Verfügung, die Aufschluss über konformationelle Parameter, im Besonderen des Tryptophans, Aufschluss gibt. Findet der genannte Energietransfer des W3 auf das zentrale Disulfid zwischen den Cysteinen 5 und 10 statt, könnte es zur Denaturierung des Peptids durch radikalische Disulfidspaltung und unkontrollierte Weiterreaktion kommen. Weitere Derivate, die kein zweites Disulfid enthalten (bspw. mit D-Serinen oder Bidisulfid-Dimere) könnten Aufschluss über die beobachtete Fluoreszenzlöschung geben. Die bereits verwendeten Peptidepitope könnten in anderen, unpolaren Lösungsmitteln wie Isopropanol vermessen werden.

3.11 Filaggrin-Foldon-Epitopchimären: Eine funktionelle Rekonstruktion

Bisher wurden Peptidepitope, deren Konformation und daraus resultierende Struktur motive auf der Basis des Filaggrinpeptids mit dem hydrophoben COCHRAN-Cluster beschrieben (vgl. Abbildung 3.1, Kapitel 3.1). Im Folgenden sollte eine Kombination des *random coil*-Filaggrin-Epitops **cfc1-cyc** mit dem strukturell und biologisch nicht verwandten Foldon-*hairpin*-Motiv (QAYVRKDGEWVLLS) durchgeführt werden.^[338,339] Letzterer wird durch andere Wechselwirkungen innerhalb des *hairpins* stabilisiert als es beim COCHRAN-Cluster der Fall ist, sodass der Einfluss einer neuen chemischen Umgebung sowie veränderter konformationeller Eigenschaften untersucht werden konnte. Aus zwei verschiedenen Mutations-Richtungen kommend war das Ziel, eine Überlappungsregion zwischen den Faltungseigenschaften des Foldon-Miniproteins und der biologischen Aktivität des citrullinierten Filaggrin-Fragments gegenüber anti-CCP-Autoantikörpern zu finden, sofern eine solche Überlappung überhaupt vorhanden ist (Abbildung 3.62).

Das C-terminale Ende des Fibrinins (aus dem Bakteriophagen T4) wird Foldon genannt und repräsentiert ein häufig verwendetes Protein-Modell, das einen trimeren, tetraedisch angeordneten β -*hairpin*-Propeller ausbildet (3 x 27 Aminosäuren).^[338,339] Die Besonderheit am daraus separierte Foldon- β -*hairpin* (Q¹AYVR⁵KDGEW¹⁰VLLS¹⁴) ist seine Eigenschaft, auch losgelöst von seiner Proteinumgebung eine stabile Sekundärstruktur aufzuweisen. Dies ist für die meisten isolierten Proteinfragmente in wässriger Lösung nicht der Fall.^[6,7] Ausgehend von dieser Sequenz werden sukzessiv die für die biologische Aktivität wichtigsten Aminosäuren in einer logisch konsistenten Reihenfolge in das Peptid eingeführt.

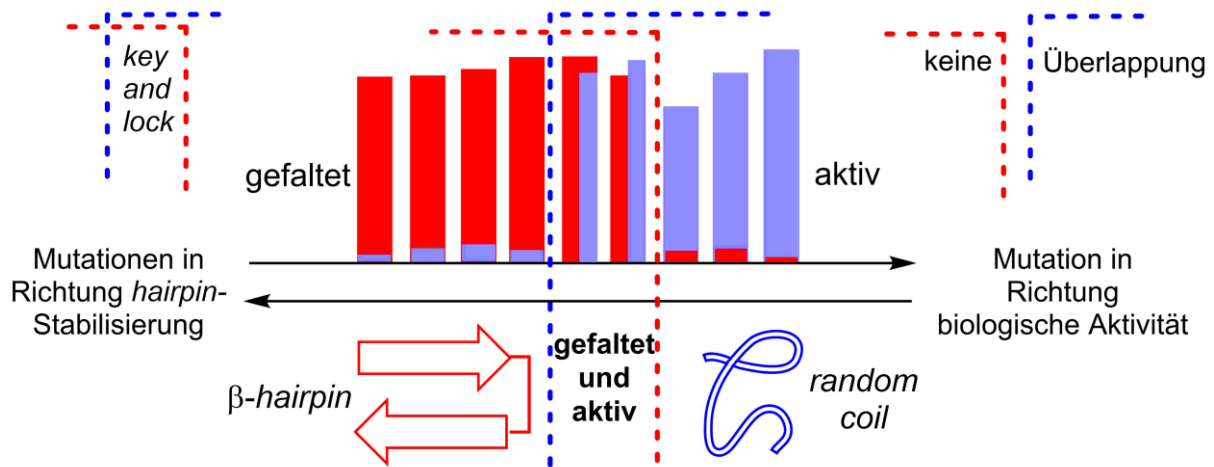


Abbildung 3.62. Die Kombination aus einem stabil gefalteten (rot) β -hairpin und einer biologisch aktiven (blau) random coil-Sequenz führt zu einem zweiseitigen Mutationsmuster. Mit einer Abfolge von schrittweisen Mutationen sollten gefaltete und biologisch aktive Epitopchimären erhalten werden, um Aussagen über die Konformations-Aktivitäts-Beziehung treffen zu können. Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass ein solcher überlappender Bereich zwischen einem gefalteten und biologisch aktiven Zustand nicht existiert.

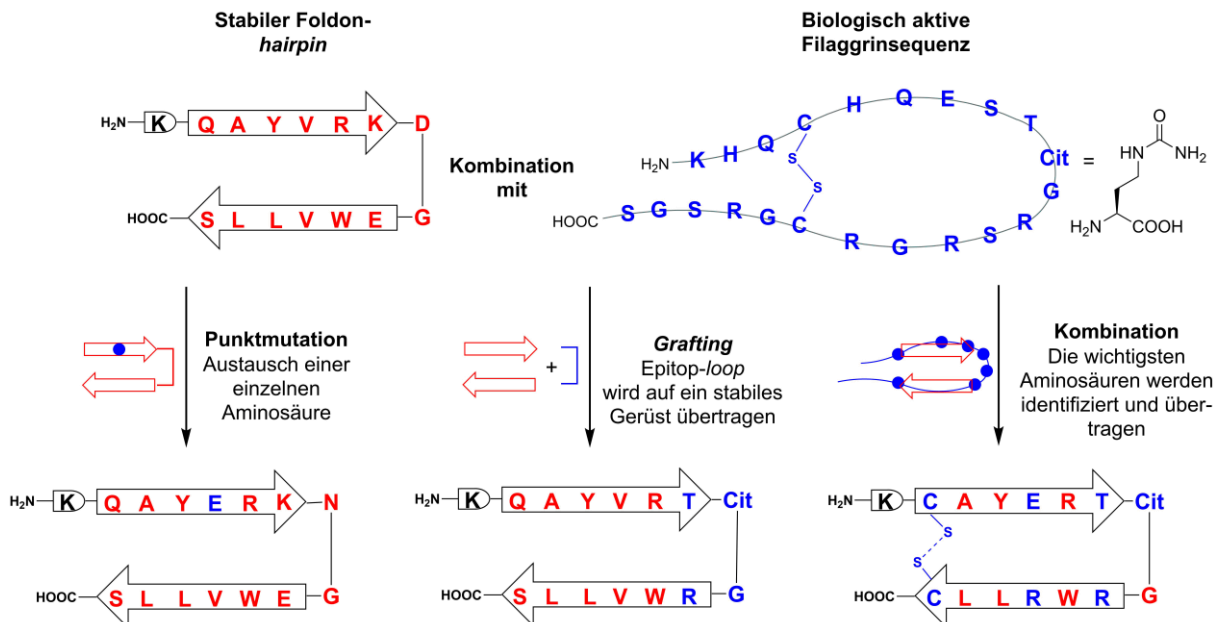


Abbildung 3.63. Mutationskonzepte zur Kombination von Peptidsequenzen. Rote Einbuchstabencodes entsprechen dem Foldon-hairpin, blaue dem Filaggrin-Epitop.

Die Faltungseigenschaften des Foldon-*hairpins* wurden dem gewählten Ansatz entsprechend mit den wichtigsten Sequenzbausteinen des citrullinierten Filaggrin-Epitops kombiniert, um ein zuvor unkorreliertes Peptid für die Rheumadiagnostik funktionell zu rekonstruieren. Dieser Ansatz steht auch im Kontrast zu anderen verwendeten Methoden, wie die systematische Erzeugung von punktmutierten Derivaten (z. B. durch Aminosäure-Positionsscans^[246] wie im Einleitungskapitel 1.9 beschrieben oder Phagen-Display^[340,341]) oder das *grafting* eines biologisch relevanten *loops* auf das stabile Foldongerüst (Abbildung 3.63).

Für die Rekonstruktion des 14er-Foldon-*hairpins* zu einem Antikörper-affinen, citrullinierten Epitop gibt es Milliarden (14!) von möglichen Mutationsreihenfolgen. Der Mutationsplan basierte deswegen auf bereits publizierten und im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Erkenntnissen, die das anti-CCP-Epitop betreffen und für eine biologische Aktivität gegenüber dem zugehörigen Paratop essentiell sind. Auf Seiten des Foldon-*hairpins* bilden die Aminosäurepaare W5/R10 sowie Y3/L12 die hauptsächlich stabilisierenden Elemente und wurden deshalb unangetastet belassen.^[342,343] Ein weiterer Vorteil dieser Paare, im Besonderen der Aminosäuren R10 und L12, sind eindeutig sichtbare und zuordenbare ¹H-NMR-Signale im Hochfeld der Spektren, und zwar dann, wenn das Peptid in wässriger Lösung eine Vorzugskonformation ausbildet. Ansonsten dient ein N-terminales Lysin der Anbindung an die Mikrotiterplatte für ELISA-Tests. In Abbildung 3.64 ist das gewählte Mutationsschema graphisch dargestellt. Alle synthetisierten Sequenzen samt Absorptionswerte aus den ELISA-Tests sind in Tabelle 3.6 wiedergegeben.

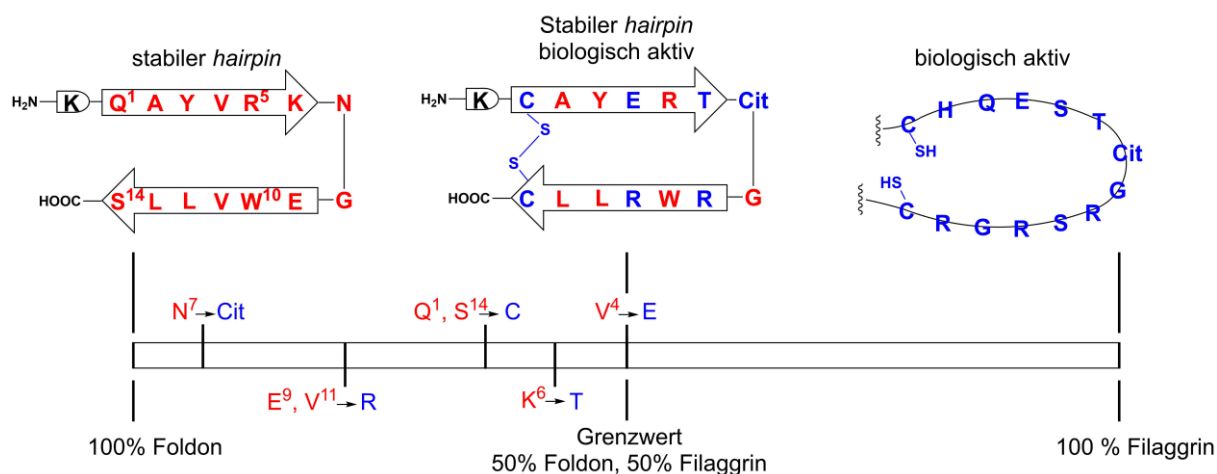
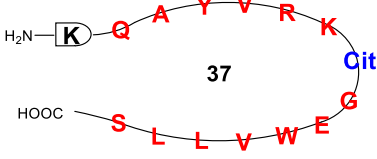
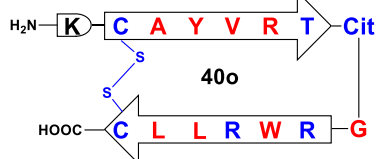
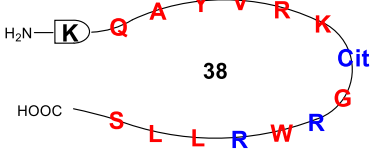
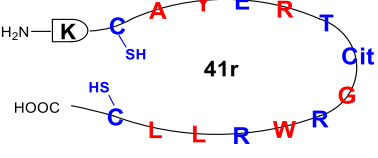
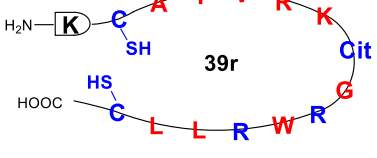
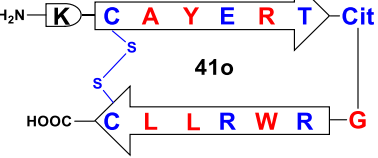
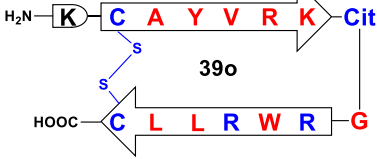
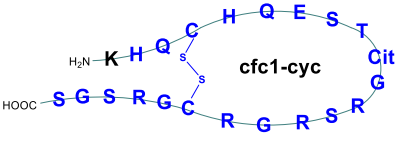
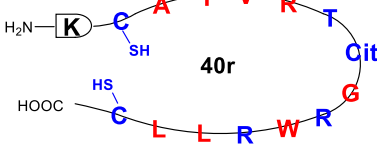
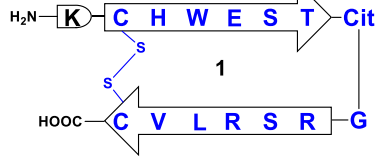


Abbildung 3.64. Geplante Abfolge von Mutationen ausgehend vom gefalteten Foldon- β -*hairpin* (rot) hin zur biologisch aktiven Filaggrin-*random-coil*-Sequenz (blau). Dabei ist ein stetiger Anstieg der Autoantikörperaffinität pro Mutation möglich oder aber es muss erst eine Grenzwertmutation erreicht werden, ab welcher das entsprechende Epitop erstmalig eine biologische Aktivität zeigt.

Tabelle 3.6. Synthetisierte Epitopchimären und Referenzpeptide mit relativen Absorptionswerten aus den ELISA (normalisiert auf Peptid **1**, gemessen bei 450 nm, siehe Balkendiagramme in Abbildung 3.66). Die Peptide wurden gegen anti-CCP-Autoantikörper getestet.

Peptide	Relative Absorption (ELISA)	Peptide	Relative Absorption (ELISA)
 <p>37</p>	0.07	 <p>40o</p>	0.10
 <p>38</p>	0.03	 <p>41r</p>	0.34
 <p>39r</p>	0.05	 <p>41o</p>	0.48
 <p>39o</p>	0.09	 <p>cfc1-cyc</p>	0.65
 <p>40r</p>	0.16	 <p>1</p>	1.00

Zunächst wurde das essentielle Citrullin als Hapten des Epitops in *i+1*-Position eingeführt.^[92] Das resultierende Peptid **37** zeigte weder eine Vorzugskonformation an (¹H-NMR-Spektrum im experimentellen Teil) noch ist es Autoantikörper-affin im anti-CCP-Test. Das L-Citrullin in *i+1*-Position ist im Gegensatz zum ursprünglichen Asp-Gly-Dipeptid nicht in der Lage, einen *turn* zu induzieren, sodass die positiven Interaktionen zwischen R5/W10 und Y3/L12 nicht ausgebildet werden können [ein von STEFAN LENZ (in bisher unveröffentlichten Ergebnissen) hergestelltes Peptid mit einem D-Citrullin in gleicher Position zeigt zwar eine Vorzugskonformation an, ist aber in hier durchgeführten ELISA-Tests inaktiv gegenüber anti-

CCP-Autoantikörpern]. Citrullin alleine ist nicht in Lage biologische Aktivität zu vermitteln, sofern es nicht die korrekte chemische Umgebung mit benötigter räumlicher Ausrichtung aufweist.

Im nächsten Schritt wurde das C-terminale Ladungsmuster des Peptidgerüsts, welches entscheidend für die Antikörperaffinität ist,^[286,344] verändert und E9 sowie V11 gegen Arginin ausgetauscht. Auch für das dementsprechend synthetisierte Peptid **38** konnte keine Vorzugskonformation und keine biologische Aktivität festgestellt werden. Der folgende Mutationsschritt umfasste die Einführung von Cysteinen an N- und C-Terminus des *Foldon-hairpins* in die Positionen von Q1 und S14. So wurde die Möglichkeit der Makrocyclisierung eröffnet, um Freiheitsgrade der Molekülbeweglichkeit einzuschränken und eine bevorzugte Konformation zu induzieren. Gleichzeitig war bekannt, dass Disulfid-cyclisierte Peptide eine höhere Antikörperaffinität (in klinischen Studien auch höhere diagnostische Spezifitäten und Selektivitäten) als ihre offenkettigen Derivate aufweisen,^[84] wobei auch die entropischen Nachteile während des molekularen Erkennungsprozesses verringert werden. Die Luftoxidation in Ammoniumcarbonat-Puffer ($c_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mg/mL}$, $\text{pH} = 8.4$) führte nicht direkt zum Disulfid-verbrückten *hairpin*-Monomer, sodass auch die reduzierte Form **39r** des Peptids isoliert werden konnte. Der Zusatz von H_2O_2 (30% in H_2O , $50 \mu\text{L}/100 \text{ mL}$ Puffer) machte die oxidierte Spezies **39o** zugänglich. Dieser Befund stellte sich als sehr nützlich heraus: Die ^1H -NMR-Spektren aller reduzierten Spezies (**39r**, **40r**, **41r**) zeigten *random coil*-Strukturen an, während die oxidierten Peptide (**39o**, **40o**, **41o**) eine hohe Dispersion und eine deutliche Hochfeldverschiebung der R10- und L12-Seitenkettensignale aufweisen, sodass eine intakte *hairpin*-Struktur bewiesen wurde. Repräsentative ^1H -NMR-Spektren der Epitopchimären **41r** und **41o** sind in Abbildung 3.65 einsehbar (alle weiteren Spektren finden sich im experimentellen Teil für die einzelnen Peptidspezies wieder). Auf diese Weise können stabile β -*hairpins* direkt mit ihrem *random coil*-Gegenspieler, die aber zumindest eine Präferenz für eine *hairpin*-Konformation aufweisen, verglichen werden.

Nichtsdestotrotz führten die Cysteine in Peptid **39** weder im reduzierten noch im oxidierten Zustand zu einer signifikanten Absorption in ELISA-Tests. Auf dem Wissen basierend, dass die direkte Umgebung von Citrullin in biologisch aktiven Epitopen eine kleine, ungeladene Aminosäure in *i*+2- und eine Alkoholfunktion in *i*-Position umfasst (bevorzugt -SCitG- oder -TCitG-),^[92,285] wurde Lysin in Position 6 gegen Threonin ausgetauscht. Die resultierenden Chimären **40r** und **40o** zeigten erneut keine Anzeichen für eine anti-CCP-Antikörperaffinität.

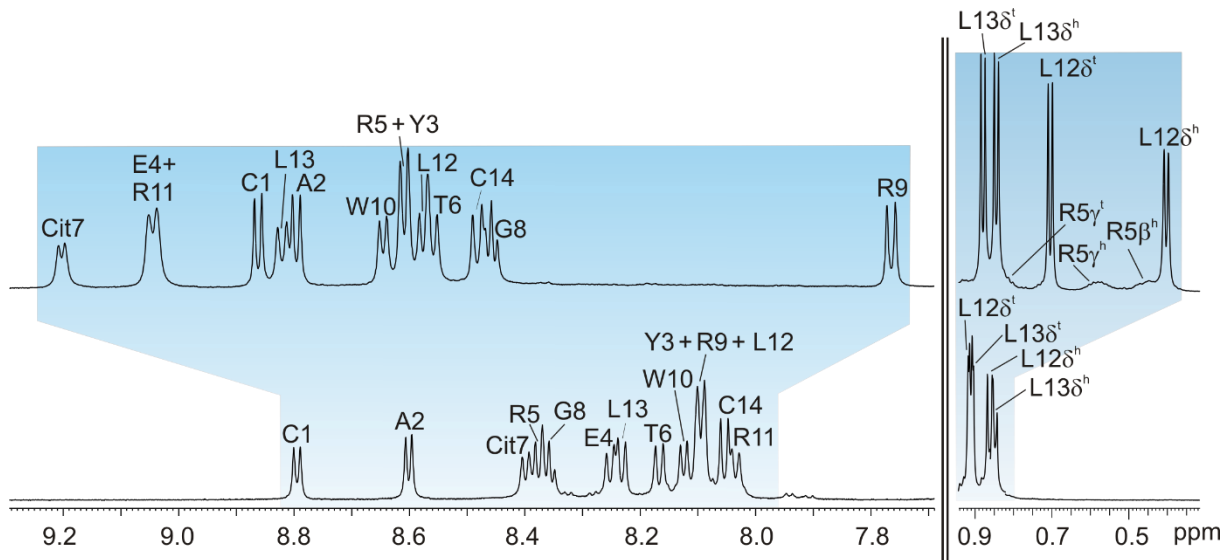


Abbildung 3.65. Vergleich der amidischen Protonen und der L12-Hd-Region der ^1H -NMR-Spektren des reduzierten Peptids **41r** (unten) und seiner oxidierten Form **41o** (oben, 600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D₂O 9:1). Das Disulfid-verbrückte **41o** zeigt eine weit höhere Dispersion im amidischen Bereich sowie die typische Hochfeld-Verschiebung der L12-H δ und R5-H β/γ -Protonensignale, was die Integrität der β -hairpin-Konformation beweist. Dagegen offenbart **41r** alle Anzeichen eines *random coil*-Peptids (h : Hochfeld, t : Tieffeld).

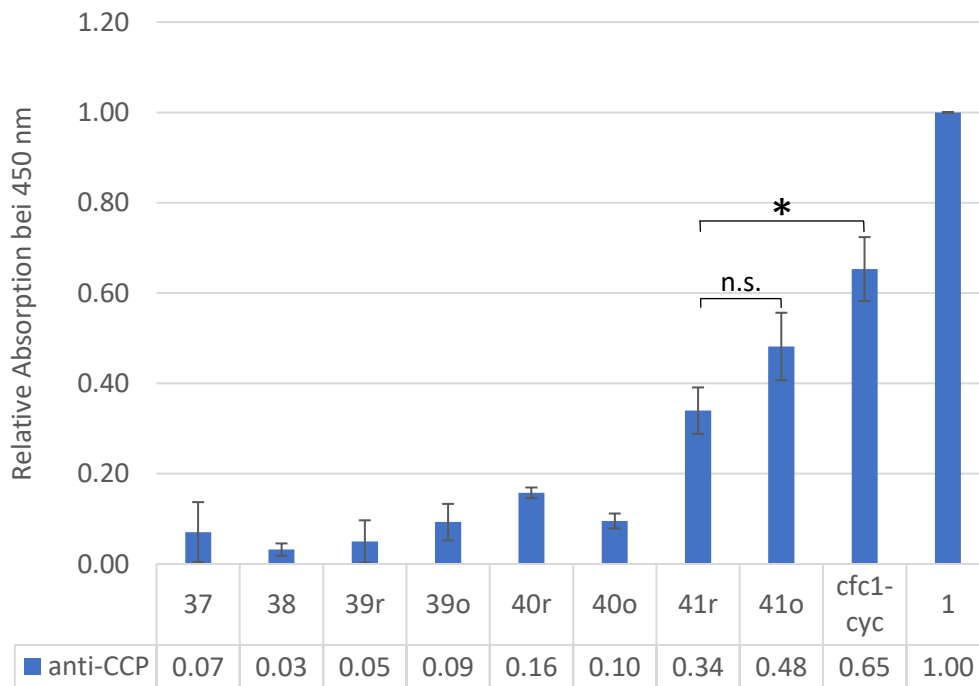


Abbildung 3.66. Ergebnisse des anti-CCP-ELISA Tests der chimären Filaggrin-Foldon-Epitope als Balkendiagramm. $P > 0.05$ (n.s.: nicht signifikant), $P < 0.05$ (*).

Wie bereits erwähnt wurden die *hairpin*-stabilisierenden Elemente R5/W10 und Y3/L12 nicht angetastet, weshalb im nächsten Schritt das N-terminale Ladungsmuster verändert wurde. Anstelle des Valin in Position 4 wurde Glutamat eingeführt. Mit dieser Mutation wurden die ersten biologisch aktiven, chimären Epitope erhalten (Abbildung 3.66 fasst die Ergebnisse der ELISA-Tests als Balkendiagramme nochmals graphisch zusammen). Die reduzierte Spezies **41r** und die oxidierte Form **41o** zeigen keine signifikante Differenz der Absorptionswerte. Die hochpopulierte β -*hairpin*-Faltung von Peptid **41o** sollte der Antikörper-gebundenen Konformation stark ähneln. Dies führt in Zusammenhang mit den ELISA-Ergebnissen zu dem Schluss, dass das *random coil*-Epitop **41r** diese räumliche Struktur annehmen und so an den Antikörper binden kann. Letzteres erfolgt also in einem *conformational selection*-ähnlichen Erkennungsprozess.

V4→E ist diesen Erkenntnissen entsprechend die Grenzwertmutation, da kein linearer Anstieg pro Mutation beobachtet wurde, sondern das chimäre Epitop erst mit einer ausbalancierten Kombination aller geplanten Mutationen biologisch aktiv wurde. Die erste aktive Sequenz **41** besteht in diesem Fall zu 50% aus Foldon- und zu 50% aus Filaggrin-Aminosäuren (siehe Abbildung 3.64). Darüber hinaus zeigt sie nur geringfügig weniger Affinität zum anti-CCP-Antikörper als das Literatur-bekannte cfc1-cyc. Dementsprechend könnte es als konformationell definiertes Epitop (im Besonderen **41o**) mit einer geringen Anzahl an Aminosäuren, die sich in ihrer chemischen Funktionalität von den bisher verwendeten Epitopen unterscheidet, in diagnostischen bzw. personalisierten Tests zum Einsatz kommen.

Um herauszufinden, ob die zuletzt durchgeführte Glutamat-Mutation einen starken Einfluss auf die *hairpin*-Konformation hat, wurde das letzte inaktive chimäre Peptid **40o** mit dem ersten aktiven Epitop **41o** verglichen. Abbildung 3.67 zeigt den Vergleich von relevanten ¹H-NMR-Spektrenauschnitten. Die E4-Mutante **41o** zeigt dabei eine geringere Gesamtdispersion der Signale, aber keine entscheidenden Veränderungen in Vergleich zu **40o**, die in irgendeiner Weise auf einen Zusammenbruch oder wichtige konformationelle Modifikationen der *hairpin*-Konformation schließen lässt. Die höhere Signaldispersion von **40o** lässt sich leicht auf die β -verzweigte Valin-Seitenkette zurückführen, da derartige Aminosäuren (abhängig vom korrekten Sequenzkontext) zur Ausbildung von β -sheets neigen.^[345] Demzufolge sollten die Kontaktpaare R5/W10 bzw. Y3/L12 in Epitop **41o** mehr Flexibilität mit einem größeren durchschnittlichen Abstand zwischen den Seitenketten besitzen. Dennoch weisen die analytischen Daten darauf hin, dass vor allem die chemische Beschaffenheit des Glutamats in Position 4 für die 'angeschaltete' biologische Aktivität verantwortlich ist. Die polare, acide Seitenkette kann Oberflächen-Wechselwirkungen mit dem Paratop eingehen, die mit der

Isopropylseitenkette des Valins nicht möglich sind. Unabhängig davon spielt die homogene und definierte räumliche Orientierung jeglicher Seitenketten die Schlüsselrolle, um solche Unterschiede in Konformations-Aktivitäts-Beziehungen zu verstehen und zugänglich zu machen.

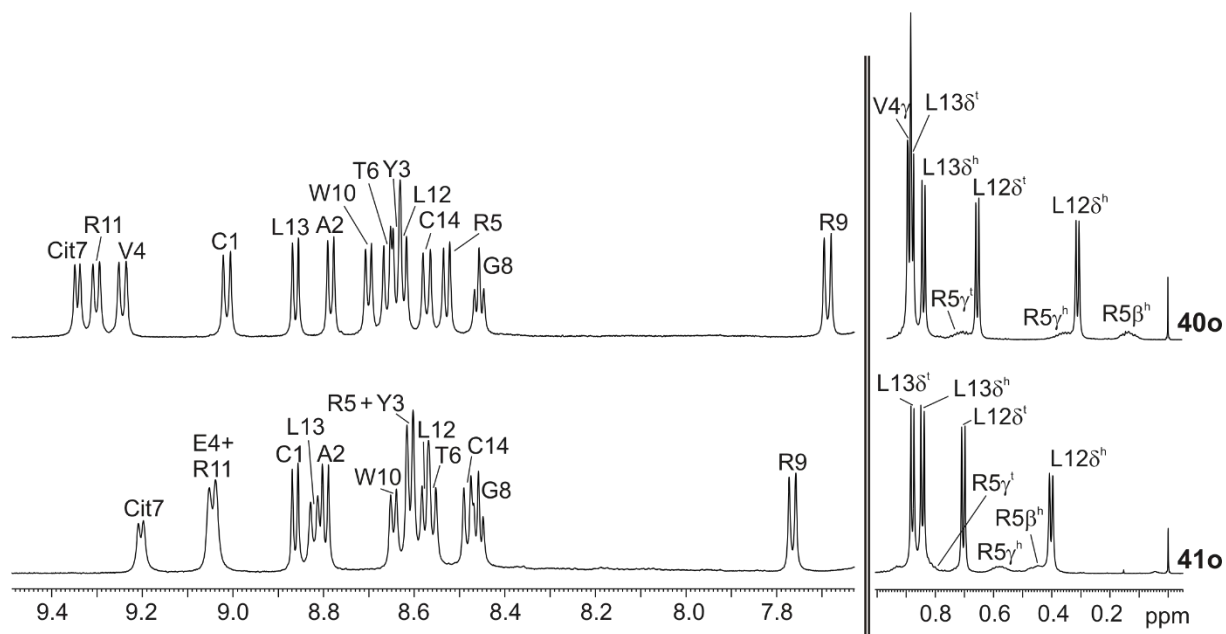


Abbildung 3.67. Vergleich der amidischen Protonen und der L12-H δ -Region der ^1H -NMR-Spektren des ersten aktiven Epitops **41o** (unten) mit dem letzten inaktiven Peptid **40o** (oben, 600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D $_2$ O 9:1).

Die Übertragbarkeit der biologischen Aktivität des Filaggrinepitops auf ein anderes, konformationell definiertes Gerüst (Foldon) wurde damit erfolgreich unter Beweis gestellt. Das gewählte, rationale Design berücksichtigte bekannte Eigenschaften des Filaggrins und des Foldons, sodass das Hapten Citrullin in eine geeignete Umgebung mit korrektem Ladungsmuster gebracht und das ursprünglich nicht verwandte Foldon funktionell rekonstruiert werden konnte. Ein einfaches *grafting*, also die $-(\text{T})\text{CitG-loop}$ -Sequenz auf das Foldon-*hairpin*-Gerüst zu übertragen, war dabei nicht zielführend. Die molekulare Natur des konformationellen Epitops geht eben über diesen vereinfachenden Ansatz hinaus. Die Rolle des E4 als wichtiger Bestandteil des **cfc1-cyc** wurde dabei bisher noch nicht beschrieben und wird Gegenstand weiterer Forschung sein (z. B. Substitution durch Glutamin, Asparagin oder Aspartat oder umgekehrt die Einführung von Valin in **cfc1-cyc**).

Desgleichen wurden Informationen über die konformationellen Eigenschaften des eigenständig faltenden Foldon-*hairpins* gewonnen. L-Citrullin in *i+1*-Position ist nicht in der Lage einen *turn* zu induzieren, sodass die Ausbildung positiver Seitenkettenwechselwirkungen ausbleibt. Die

Option der Makrocyclisierung durch terminale Disulfide hilft dabei, diese Limitierung zu überwinden. Dementsprechend bietet der Foldon-*hairpin* auf der Grundlage weniger Mutationen ein synthetisch flexibles Gerüst zur Epitoppräsentierung.

3.12 Die Nachbarn des Citrullin

Citrullin stellt das Hapten des Epitops dar und ist unerlässlich für die Antikörpererkennung.^[92] Doch ohne die korrekte chemische und konformationelle Umgebung bleibt das Antigen inaktiv. Schon die ersten Veröffentlichungen von SCHELLEKENS (1998, 2000)^[84,92] sowie GIRBAL-NEUHAUSER (1999)^[285] weisen auf das SCitG/TCitG als konserviertes Motiv in den biologisch aktivsten Filaggrinfragmenten auf. Diese Hypothese, nach der eine Alkoholfunktionalität direkt vor dem CitG-Dipeptid eine höhere Antikörperaffinität zur Folge hat, wurde einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Das im *turn* des β -*hairpins* befindliche Motiv wurde dafür auf dem Sekundärstruktur-stabilisierenden stabilen COCHRAN-Cluster präsentiert und die biologische Aktivität damit unter ansonsten gleichen konformationellen Bedingungen verglichen. Ausgehend von Referenzepitop **1** mit der Sequenz K⁰C¹HWEST⁶CitGRSRLVC¹⁴ wurde das Threonin in Position 6 einerseits gegen Serin (Peptid **42**) ohne β -Verzweigung, andererseits gegen Valin (Peptid **43**) mit β -Verzweigung aber ohne Alkoholfunktion ausgetauscht (Abbildung 3.68). Damit können Veränderungen in der Antikörperaffinität direkt auf die chemische Beschaffenheit der Aminosäure in *i*-Position zurückgeführt werden.

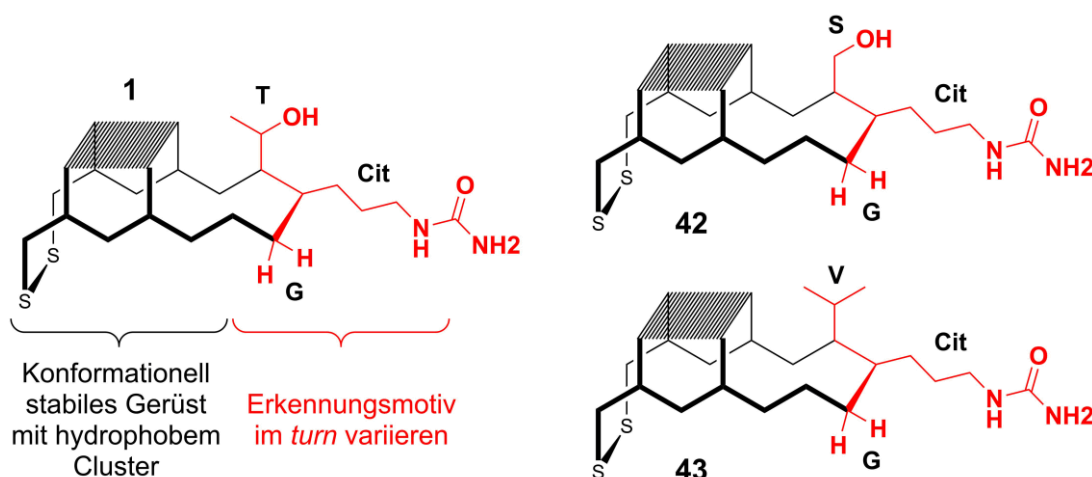


Abbildung 3.68. Konzept und Peptide (schematisch) zur Untersuchung der direkten Umgebung des Haptens Citrullin. Dabei werden XCitG-Motive (X: Thr, Ser, Val, Sequenz: K⁰CHWESX⁶CitGRSRLVC) auf einem durch den COCHRAN-Cluster konformationell stabilen *hairpin*-Gerüst präsentiert.

Um die Validität der Vorgehensweise zu überprüfen, wurde zunächst untersucht, ob eine Mutation in Position 6 des β -hairpins einen gravierenden Einfluss auf die Sekundärstruktur hat, und wenn ja, welchen. Dafür wurde sich der NMR-Spektroskopie bedient. Abbildung 3.69 zeigt zugeordnete ^1H -NMR-Spektrenausschnitte der Peptide **1**, **42** und **43**. Die Signaldispersionen und -verschiebungen unterscheiden sich nur geringfügig, ebenso wie die Dispersion und Hochfeldverschiebung der Leu-H δ -Protonen. Die β -hairpin-Konformation bleibt also bei allen Peptiden erhalten.

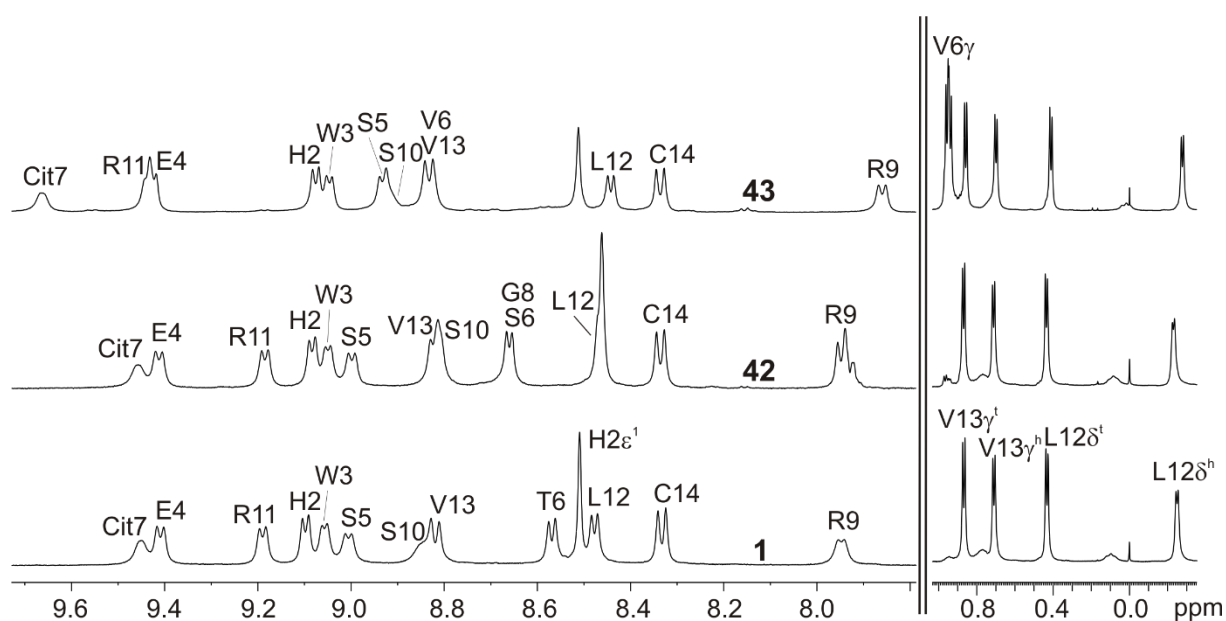


Abbildung 3.69. ^1H -NMR-Spektrenausschnitte (amidischer und L12-H δ -Bereich) der Peptide **1**, **42** und **43** (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D $_2$ O 9:1).

Im Detail wird mit Valin eine noch höhere Dispersion erreicht als mit den anderen beiden Aminosäuren, das Cit7-NH ist bis auf 9.66 ppm ins Tieffeld verschoben (im Vergleich zu 9.46 ppm für **1** und **42**), das auf dem C-terminalen Strang V6 direkt gegenüberliegende R11-NH bis auf 9.43 ppm (im Vergleich zu 9.18 ppm). Dies ist deshalb interessant, da Threonin mit seinem zweiten Stereozentrum (*R*-konfiguriert) in der Seitenkette eine noch klarere Ausrichtung und Unterscheidung bezüglich der Methyl- und der Hydroxyfunktion erlauben sollte. Gleichzeitig besitzt Serin in Peptid **42** keine β -Verzweigung, das Epitop zeigt aber die so gut wie identischen chemischen Verschiebungen und Dispersionswerte wie das T6-Derivat **1**. In beiden Fällen sind die Kopplungskonstanten für α - und β -Protonen gemittelt (etwa 7 Hz), zeigen also keine Vorzugsausrichtung der Seitenkette an. Die γ -Protonen von V6 in **43** zeigen zwar nur eine geringe diastereotope Aufspaltung, die jeweiligen Kopplungskonstanten zum H β (das zu ungewöhnlichen 1.98 ppm entschirmt ist) sind jedoch mit jeweils 7.1 Hz auslesbar und

damit ebenso gemittelt. Entscheidend scheint also nicht die β -Verzweigung, sondern ganz generell das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der Hydroxyfunktion in der Seitenkette. Eine Inversion des T6- β -Stereozyentrums zur *S*-Konfiguration, also der Einbau von *L*-allo-Threonin, könnte genauere Informationen über die Seitenkettenausrichtung und die Bedeutung von Hydroxy- sowie Methylfunktionalität innerhalb des Peptidrückgrats liefern.

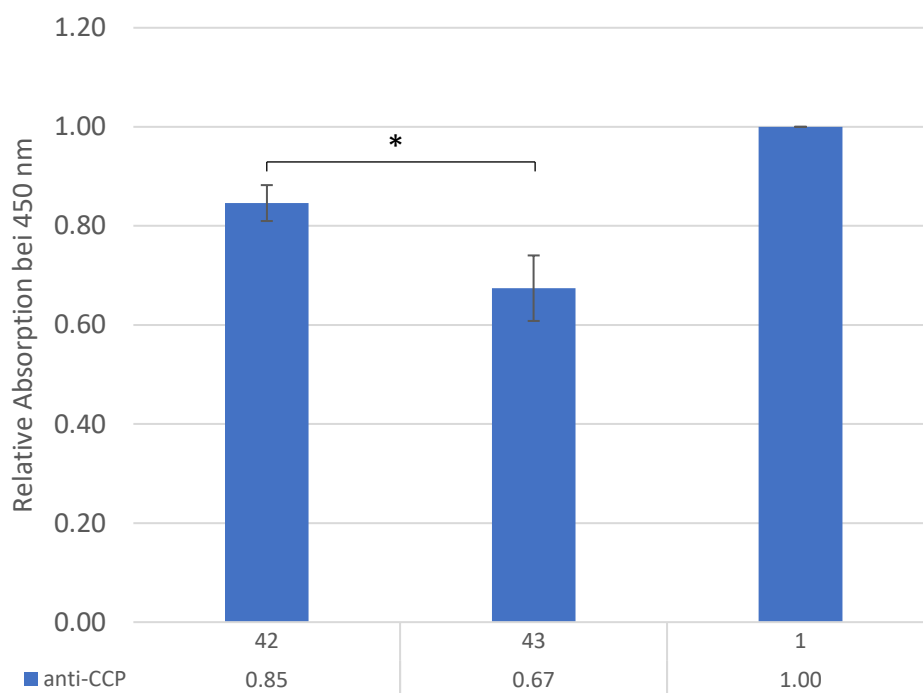


Abbildung 3.70. Ergebnisse des anti-CCP-ELISA Tests der Peptide **1**, **42** und **43** als Balkendiagramm. $P > 0.05$ (n.s.: nicht signifikant), $P < 0.05$ (*).

Im Folgenden wurde der Einfluss der Aminosäure in Position 6 auf die anti-CCP-Antikörperaffinität überprüft. Die Ergebnisse der ELISA-Tests sind in Abbildung 3.70 einzusehen. Das aktivste Epitop bleibt das Referenzpeptid **1** mit der TCitG-Sequenz im *turn*. Ein Austausch des T6 durch Serin in Peptid **42** hat nur eine geringe Abnahme der Absorptionswerte zur Folge. Peptid **43** weist mit der hydrophoben Seitenkette des V6 nur etwa zwei Drittel der Affinität von **1** auf. Die Alkoholfunktion in Position 6 sorgt also für aktivere Epitope, ihre Abwesenheit führt jedoch nicht zu einem vollständigen Affinitätsverlust. Da die Konformationen der Peptidantigene sehr ähnlich sind, resultieren die Unterschiede in der biologischen Aktivität aus einer veränderten Wechselwirkung mit dem Antikörper. Die Oberflächenwechselwirkungen zwischen Epitop und Paratop sind offensichtlich ausgeprägter, wenn direkt vor dem Hapten Citrullin eine Hydroxy-funktionalisierte Aminosäure vorhanden ist. Mithilfe des verwendeten formstabilen *hairpin*-Gerüsts lässt sich also der Beitrag zur

Antikörperaffinität einzelner Aminosäuren unter räumlich gleicher Ausrichtung der Seitenketten bestimmen. Der bisher rein empirische Befund der Literatur wird mit den beschriebenen konformationellen Details bestätigt und erweitert.

3.13 Turn-Geometrie

Nachdem im letzten Kapitel geklärt wurde, welche die geeignete chemische Umgebung für das Citrullin ist, soll in diesem Abschnitt auf die *turn*-Geometrie eingegangen werden. β -turns werden generell als Tetrapeptid-Segmente mit den Aminosäuren i , $i+1$, $i+2$ und $i+3$.^[346] Sie werden anhand der *backbone*-Konformation der beiden zentralen Aminosäuren in $i+1$ und $i+2$ -Position definiert, repräsentiert durch die Torsionswinkel φ_{i+1} , ψ_{i+1} , φ_{i+2} und ψ_{i+2} . Die vier am häufigsten in Peptiden und Proteinen vorkommenden Typen sind β I und β II, sowie deren Spiegelbilder β I' und β II'.^[12,311,347] Gleichzeitig können die beiden *turn*-Typen β I und β II in einem dynamischen Austausch stehen (der für Referenzpeptid **1** bereits in Kapitel 3.3 beschrieben wurde).^[276] Gleiches gilt für β I' und β II'. Die betroffenen Aminosäuren in Referenzpeptid **1** sind also Citrullin und Glycin. Es wurde systematisch untersucht, welche Anordnung in welcher Konfiguration einen Einfluss auf die Antikörperaktivität besitzt. Ausgehend von der Sequenz $\text{K}^0\text{C}^1\text{HWE}^2\text{STC}^3\text{it}^4\text{G}^5\text{R}^6\text{SRLVC}^7$ ¹⁴ entstanden also die Derivate **44** (GCit), **45** (citG) und **46** (Gcit). Die so veränderten *turn*-Geometrien wurden dem modularen Prinzip entsprechend also auf einem konformationell stabilen Gerüst präsentiert (Abbildung 3.71), sodass Änderungen in der biologischen Aktivität direkt auf diese Modifikationen zurückgeführt werden können.

Zunächst erfolgt der direkte Vergleich der ¹H-NMR-Spektren in Bezug auf Signaldispersion im amidischen Bereich und der L12-H δ -Hochfeldverschiebung (Abbildung 3.72). Diese Parameter erweisen sich als ähnlich bis identisch unter allen vermessenen Spezies. Die amidischen Protonen der Aminosäuren des hydrophoben Clusters (C1-E4...R11-C14) behalten nahezu konstante Verschiebungswerte. Die verhältnismäßig geringste Dispersion hat dabei Peptid **44** (G7Cit8), die verhältnismäßig höchste Epitop **45** (citG), gefolgt von **46** (Gcit). Eine D-Aminosäuren in Position $i+1$ oder $i+2$ ist für die Ausbildung einer *turn*-Struktur nämlich durch einen 'stereochemischen Knick' im *backbone* besonders günstig. Glycin ist in allen hier synthetisierten Peptidspezies vertreten und durch seine Flexibilität beim Annehmen verschiedenster φ - und ψ -Winkel gleichzeitig eine der am häufigsten vorkommenden Aminosäuren in *turns*.^[347] In diesem Zusammenhang ist die starke Hochfeldverschiebung (zusammen mit einer geringen Temperaturabhängigkeit $\Delta\delta/\delta T$ sicheres Anzeichen einer H-

Brücke) des R9-NH in $i+3$ -Position besonders aussagekräftig und zeigt ganz allgemein die Ausbildung des *turns* in dieser Region des *hairpins* an.

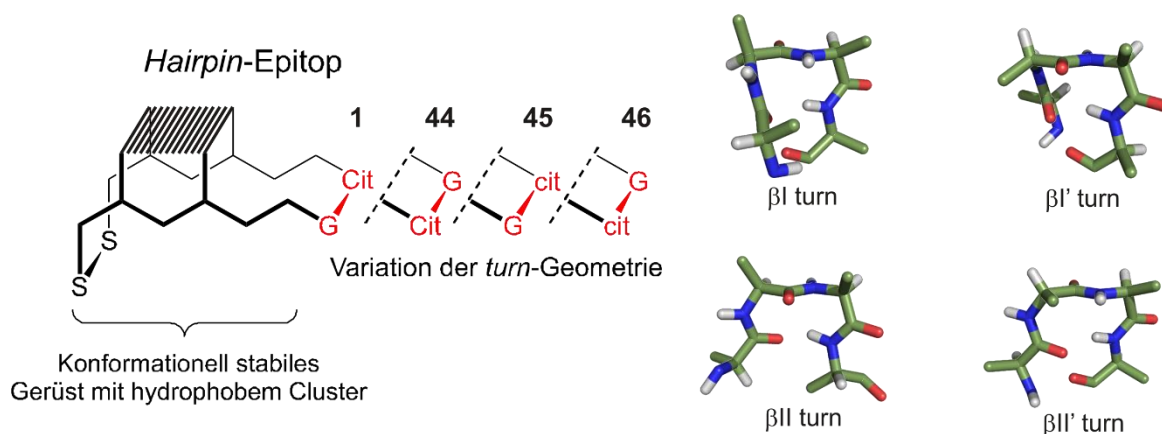


Abbildung 3.71. Konzept und Peptide (schematisch) zur Untersuchung des Einflusses der *turn*-Geometrie auf die Antikörperaffinität der jeweiligen Peptidepitope. Dabei wurde die Anordnung und Konfiguration der Aminosäuren in $i+1$ und $i+2$ -Position des *turns* variiert.

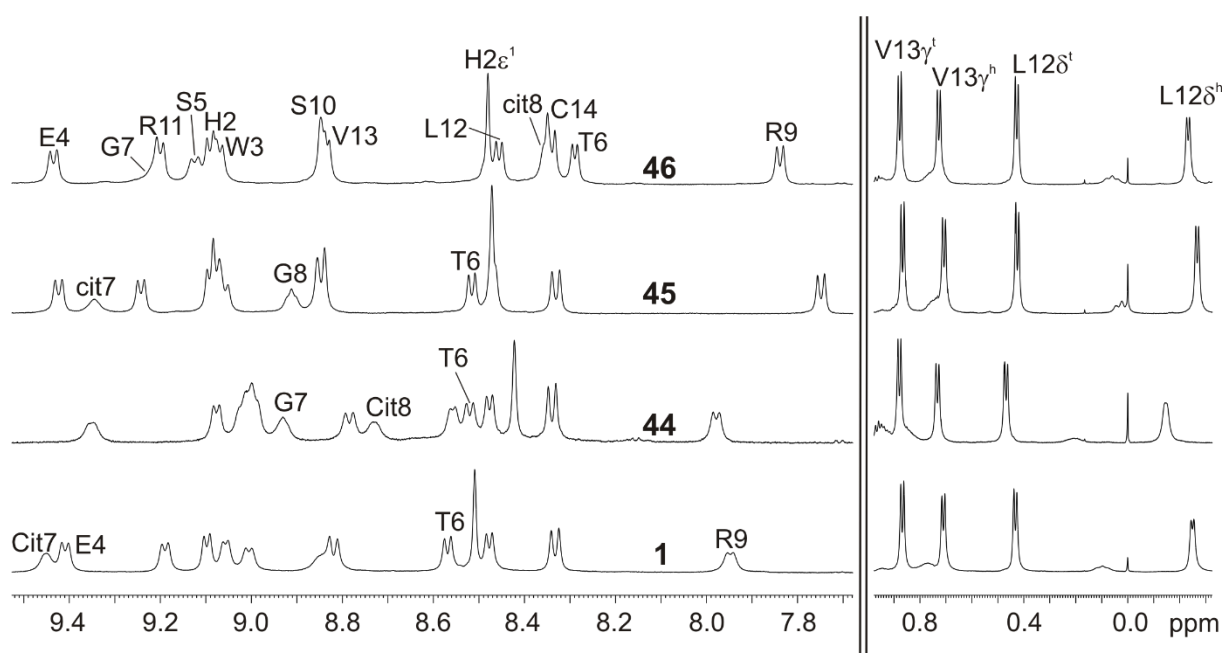


Abbildung 3.72. ^1H -NMR-Spektrenauschnitte (amidischer und L12-H δ -Bereich) der Peptide **1** und **44** bis **46** (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D $_2$ O 9:1).

Im Gegensatz zum Referenzpeptid **1** (CitG) sind bei allen anderen Spezies **44** bis **46** sowohl das Glycin-NH als auch das Citrullin-NH in den ^1H -NMR-Spektren vorhanden, wobei es sich nichtsdestotrotz um relativ breite Signale handelt. Der bereits erwähnte dynamische Wechsel zwischen βI - und βII -Typ bzw. zwischen $\beta I'$ - und $\beta II'$ -Typ ist als konformationeller Austausch

dafür verantwortlich. Die energetische Barriere und damit die Geschwindigkeit des Prozesses ist für die verschiedenen, *turn*-variieren Spezies dementsprechend unterschiedlich.

Ein Vorteil des Vorhandenseins von NH-Signalen in *i+1*- und *i+2*-Position stellt die Möglichkeit dar, potentielle NOEs auszulesen. In diesem Fall hält sich die Anzahl an sichtbaren Signalen dieser *backbone*-Protonen (NH/NH, NH/ α , α/α) im *turn*-Bereich in Grenzen, wobei natürlich auch die Abwesenheit von Signalen eine entscheidende Information sein kann. Abbildung 3.73 zeigt die NH/NH-Projektion der NOESY-Spektren der Epitope **44** bis **46**. Während bei **44** kein Kreuzsignal zwischen der *i+2*-Position (Cit8) und der *i+3*-Position (R9) vorhanden ist, koppeln in **45** G8-NH und R9-NH schwach miteinander, in **46** cit8-NH und R9-NH sogar relativ stark. Dieser Kontakt lässt Informationen über die räumliche Anordnung des amidischen Protons in *i+2*-Position zu. Während in β -*turns* des Typs I und II' dieses NH in den peptidischen Makrozyklus hineinzeigt, orientiert es sich in Typ I'- und II'-*turns* in die entgegengesetzte Richtung (vgl. auch Abbildung 3.71). Eine wichtige Zusatzinformation ist in diesem Zusammenhang, dass für β -*hairpins*, die sich nicht in Proteinumgebung befinden, besonders oft β I'- und β II'-*turns* beobachtet werden, da sie besser zum rechtshändigen *twist* der antiparallelen β -*sheets* passen.^[311,348] β I weist einen linksgängigen *twist* auf und wird daher seltener beobachtet, β II'-*turns* werden überhaupt nicht beobachtet (insgesamt kommen β I und β II in Proteinen am häufigsten vor). Während in β -*hairpins* **44** also wahrscheinlich ein *turn* des Typs β I' vorliegt, könnte es sich bei den Epitopen **45** und **46** mit D-Aminosäuren im *turn* um β II'-*turns* handeln. Eine eindeutige und endgültige Zuordnung ist auf dieser experimentellen Grundlage nicht möglich, gibt aber wichtige Hinweise und zeigt im Besonderen im Vergleich der Spezies untereinander tatsächlich vorhandene Unterschiede in der *turn*-Geometrie an.

Die gewonnenen konformationellen Informationen wurden anschließend mit der Affinität der Peptidepitope **1** und **44** bis **46** gegenüber anti-CCP-Autoantikörpern korreliert (das zugehörige Balkendiagramm findet sich in Abbildung 3.74 wieder). Antigen **44** (GCit) zeigt etwa ein Viertel der Absorption von Referenzpeptid **1**, Antigen **45** (citG) etwa ein Drittel. Sequenz **46** (Gcit) dagegen ist biologisch inaktiv. Einen entscheidenden Einfluss auf die Affinität hat damit die Positionierung von Citrullin in *i+1*- oder *i+2*-Position in Kombination mit dessen Stereochemie (dessen Seitenkettenorientierung).

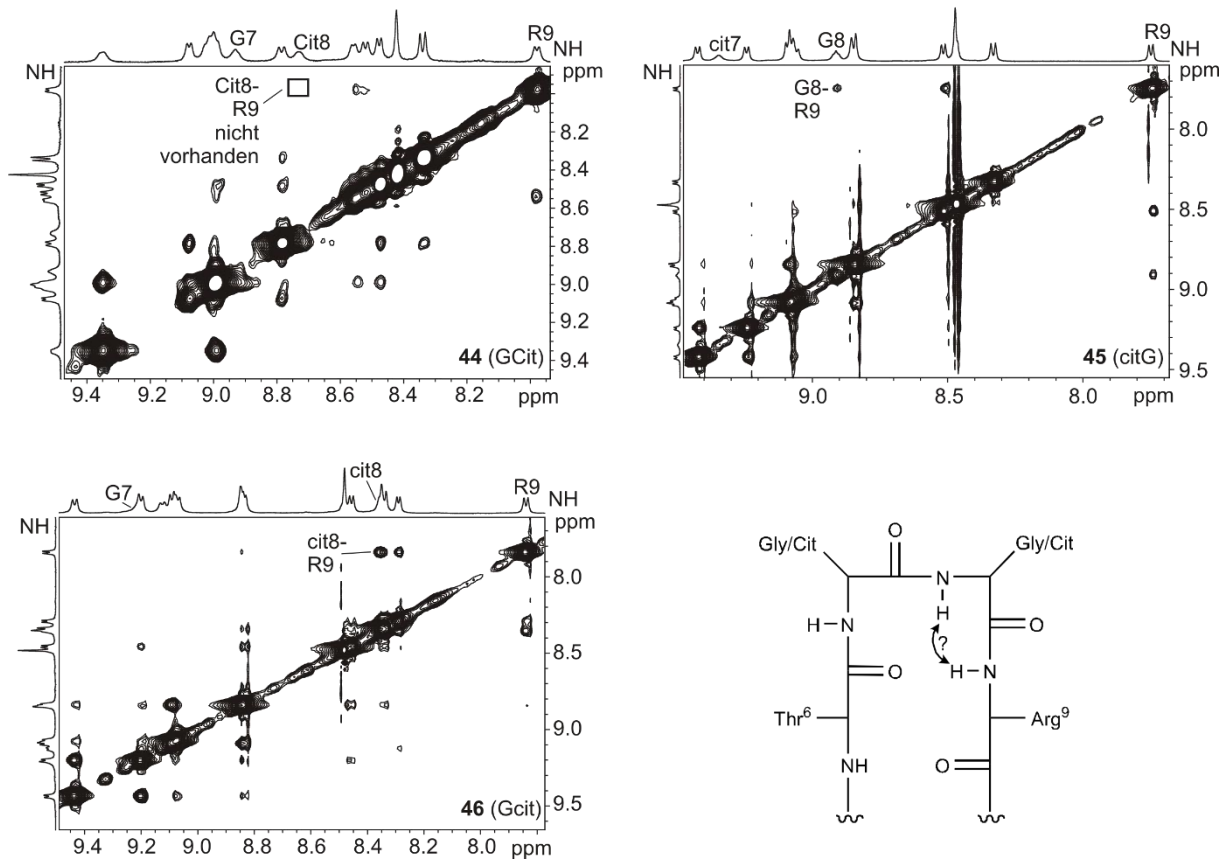


Abbildung 3.73. Ausschnitte aus den NOESY-Spektren (amidischer Bereich) der Peptide **1** und **44** bis **46** (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D₂O 9:1). Relevant sind dabei potentielle Kontakte zwischen den amidischen Protonen des *turn*-Bereichs.

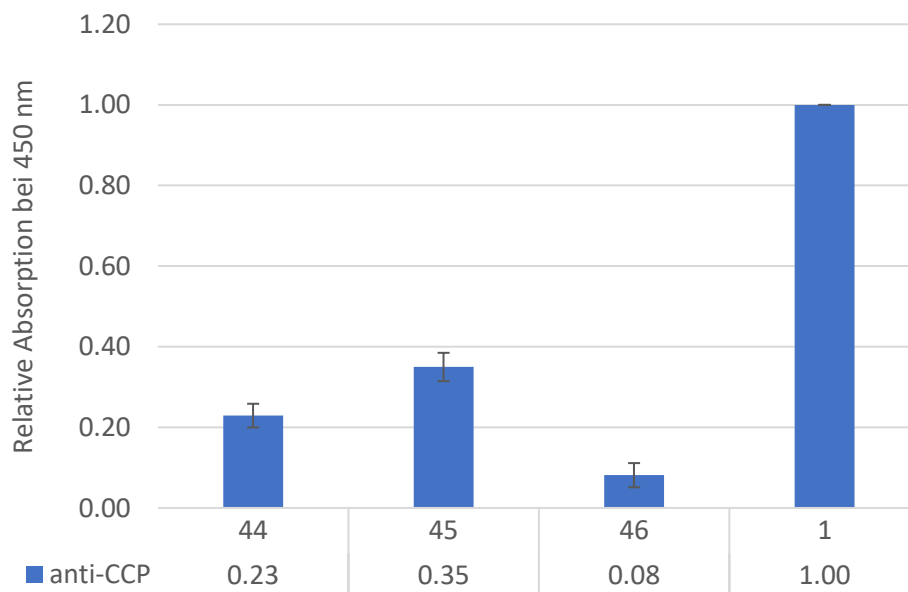


Abbildung 3.74. Ergebnisse der ELISA-Tests der *turn*-variieren Peptidpitope **1** und **44** bis **46** gegen anti-CCP-Antikörper, dargestellt als Balkendiagramm.

L-Citrullin in *i*+2-Position (Peptid **44**) wird nur noch in geringem Maße vom Antikörper erkannt. Die räumliche Ausrichtung des Haptens im Vergleich zum konformationell stabilen hydrophoben Cluster verändert sich zu stark, um eine optimale Oberflächenwechselwirkung zu gewährleisten. D-Citrullin in *i*+1-Position (Peptid **45**) hat eine ähnliche Wirkung und ist deshalb so viel weniger affin als Referenzpeptid **1** mit einem L-Citrullin. Da Letzteres im Organismus aus L-Arginin entsteht und die Immunantwort im Speziellen auf diese Aminosäure ausgerichtet ist, mag dieses Ergebnis kaum verwundern. Das Zusammenwirken von veränderter Stereochemie und *turn*-Position bewirkt für Peptid **46** dann den vollständigen Affinitätsverlust. Die in Lösung hochpopulierten β -*hairpin*-Spezies liefern detaillierten Aufschluss über die Beschaffenheit des *turns*, und in diesem Zusammenhang über die Ausrichtung des Haptens Citrullin. Da sie sich in Position, Stereochemie und Orientierung unterscheiden, sind diese Peptidepitope Kandidaten für Tests mit Blutseren von RA-Patienten. So könnten weitere konformationsselektive Antikörper entdeckt werden, die bspw. im Speziellen D-Citrullin erkennen. Des Weiteren bietet der Austausch des hier durchgehend verwendeten Glycins durch Seitenketten-funktionalisierte Aminosäuren tiefergehende Informationen über räumliche Strukturen und veränderte Antikörperaffinitäten (ein erstes Experiment dazu lieferte SABRINA FISCHER mit dem Einbau von D-Ala in *i*+2-Position des **cfc1-cyc** und einer mit dem hydrophoben Cluster derivatisierten 22er-Variante, die beide geringere Affinitäten aufwiesen)^[272].

3.14 Die Seitenkettenlänge des Haptens - Homologe des Citrullins

In den vorhergehenden Kapiteln wurde sukzessive von globalen *backbone*-Veränderungen (Doppel-D-Aminosäure-Design, Deletion, Dimerisierung, Übertragung des Epitops auf ein neues *hairpin*-Gerüst), über die Aufklärung der direkten und entfernten Citrullinumgebung bis hin zur *turn*-Struktur und Stereochemie auf Besonderheiten und Details der RA-Peptidantigene eingegangen. Die Untersuchung und Modifikation der Seitenkette des Haptens L-Citrullin, die drei Methylengruppen samt Harnstoff umfasst, geht damit sozusagen noch eine Molekülebene tiefer. Wie in Abbildung 3.75 dargestellt wurde die Seitenkette systematisch verlängert (vier Methylengruppen: Homocitrullin, Hci) und verkürzt (zwei Methylengruppen: 2-Amino-4-ureidbuttersäure, Aub; eine Methylengruppe: Albizziin, Alb).

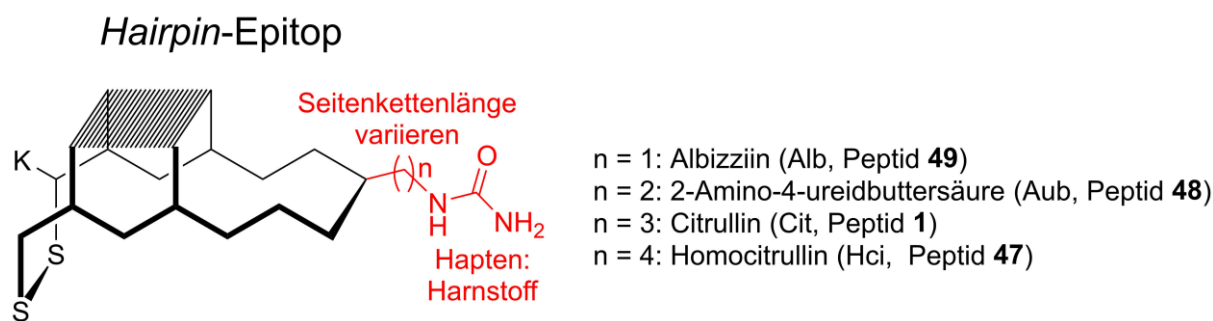


Abbildung 3.75. Systematische Verlängerung und Verkürzung der Hapten-Seitenkette.

Das um eine Methylengruppe verlängerte Homocitrullin wurde ausgehend von Lysin (**AS1**) hergestellt (Abbildung 3.76). Dabei wird mittels eines Cu(II)-Salzes (hier Kupfersulfat) in wässriger Natriumcarbonatlösung ein Lysin-Kupfer-Komplex erzeugt, sodass Amino- und Carboxyfunktionen komplexiert sind und folglich nicht mehr für eine Reaktion zur Verfügung stehen. Damit konnte das Seitenkettenamin mit Kaliumisocyanat zur Reaktion gebracht werden, sodass in einer nukleophilen Addition bei 40 °C der Harnstoff ausgebildet wurde. Dekomplexierung mit 8-Hydroxychinolin in einem Aceton-Wasser-Gemisch (1:1) führte zum ungeschützten H-Hci-OH (**AS2**). Durch eine S_N2 -Reaktion mit Fmoc-OSu unter basischen Bedingungen in Dioxan/Wasser (1:1) entstand im abschließenden Schritt das Fmoc-Hci-OH (**AS3**).

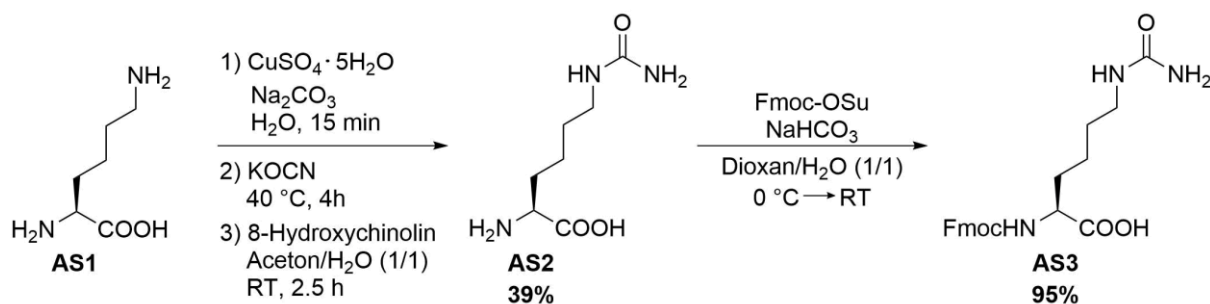


Abbildung 3.76. Syntheschema zur Umsetzung von Lysin (**AS1**) über einen Kupferkomplex zum Homocitrullin (**AS2**) mit anschließender Fmoc-Schätzung (**AS3**).

Die verkürzten Citrullin-Derivate wurden über eine alternative Syntheseroute hergestellt (Abbildung 3.77). Ausgehend von den $N\alpha$ -Fmoc-geschützten Aminosäuren Asparagin (**AS4**) oder Glutamin (**AS5**), die beide eine Amidfunktion in der Seitenkette tragen, wurden über eine HOFMANN-Umlagerung mit Phenyliod(III)bis(trifluoracetat) (kurz PIFA) die um die CO-Gruppe verkürzten Diamine Fmoc-Dap-OH (Diaminopropionsäure, **AS6**) und Fmoc-Dab-OH (Diaminobuttersäure, **AS7**) synthetisiert. Anschließende nucleophile Addition an KOCN, in

diesem Fall unter sauren Bedingungen bei 80 °C, führte zu den verkürzten Citrullin-Derivaten Fmoc-Alb-OH (**AS8**) und Fmoc-Aub-OH (**AS9**).

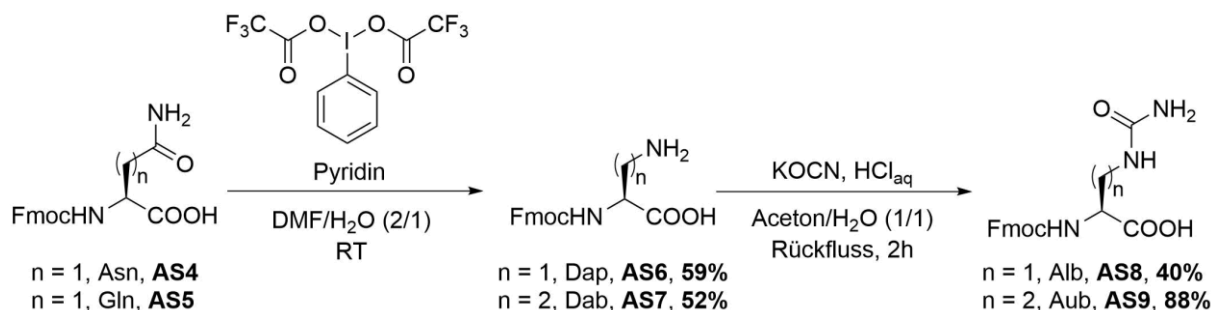


Abbildung 3.77. Syntheschema zur Umsetzung von Lysin über einen Kupferkomplex zum Homocitrullin mit anschließender Fmoc-Schätzung.

Die so erhaltenen Fmoc-Aminosäurebausteine konnten ohne weitere Schützungs-schritte in der SPPS eingesetzt werden. Dabei wurden die in Abbildung 3.75 angezeigten Epitope **47-49** erhalten. Deren amidische Bereiche der ¹H-NMR-Spektren (zusammen mit dem citrullinhaltigen Referenzpeptid **1**) sind in Abbildung 3.78 dargestellt. Diese bestätigen, dass die globalen Konformationen aller *β-hairpin*-Peptide identisch sind. Nur Position 7, in der sich das jeweilige Citrullin-Homologe befindet, zeigt minimale Verschiebungsunterschiede. Somit können im Folgenden Affinitätsunterschiede direkt auf die veränderte Seitenkettenlänge der Haptene verändert werden.

Die Affinitätsmessungen sind in Abbildung 3.79 als Balkendiagramm dargestellt. Die Peptide **48** (Alb7) und **49** (Aub7) mit den kürzeren Citrullin-Derivaten werden vom Antikörper nicht erkannt. Die Antikörperbindung wird meist so vermittelt, dass das Hapten in einer Spalte (engl. *crevice*, siehe auch Kapitel 1.7) in der Proteinoberfläche gebunden wird, während der Rest des Peptidantigens mit der komplementären Proteinoberfläche wechselwirkt.^[9,349] Der anti-CCP-Antikörper erkennt die kürzeren Citrullinderivate alleine auf Grundlage einer bzw. zweier fehlender Methylengruppen nicht mehr, was darauf schließen lässt, dass die Harnstoffgruppe nicht mehr weit genug in den Oberflächenspalt hineinragt. Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe Selektivität der Epitop-Paratop-Bindung. Darüber hinaus wurde bisher nicht beschrieben, dass derartige Aminosäuren im entzündeten Gewebe eines RA-Patienten auftreten.

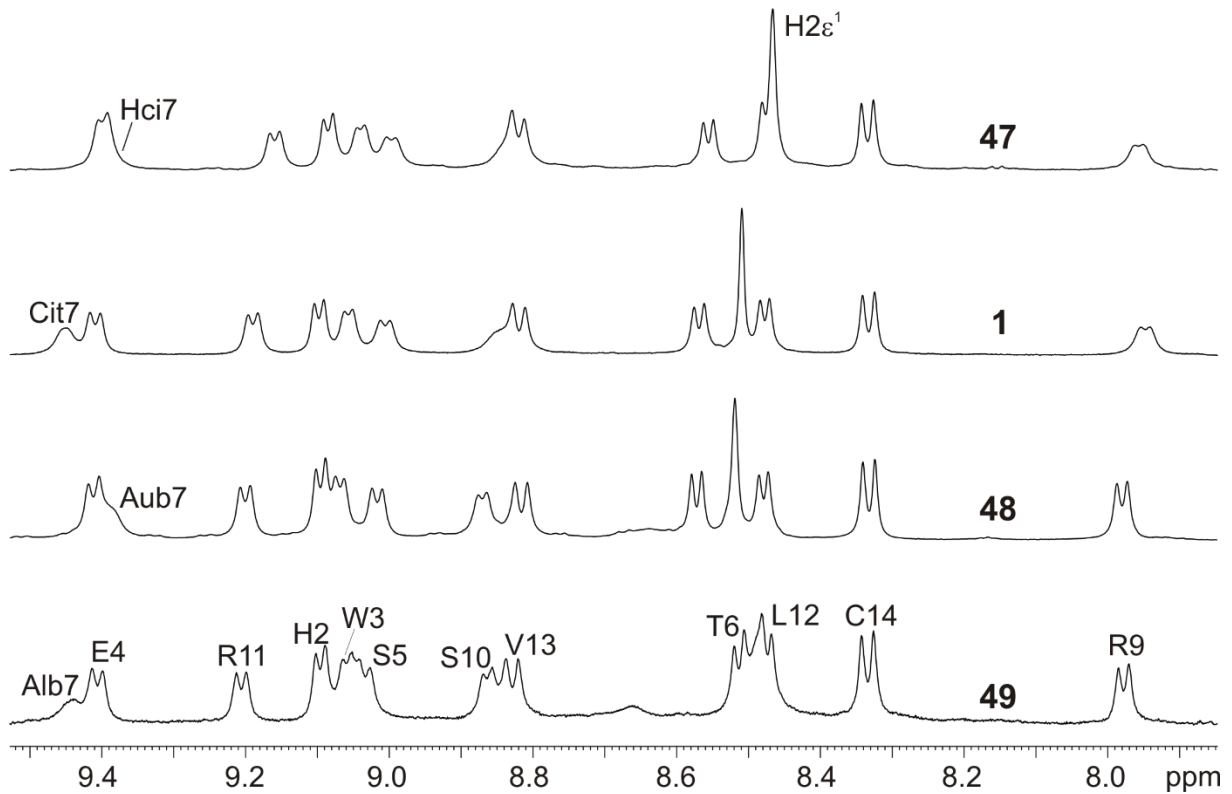


Abbildung 3.78. Amidische Bereiche der ¹H-NMR-Spektren der Peptidepitope **1** und **47** bis **49**, die verschiedene Citrullin-Homologe in Position 7 tragen (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D₂O 9:1).

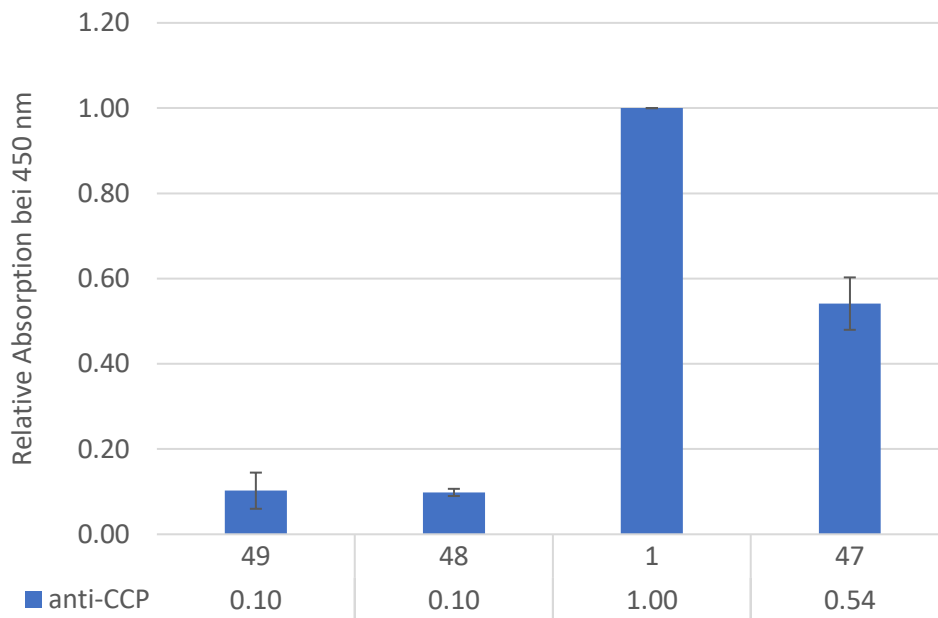


Abbildung 3.79. Gemessene Absorptionswerte der Hapten-variierten Epitope **47** (Hci), **48** (Aub) und **49** (Alb) in ELISA-Tests relativ zum besten Binder **1** (Cit).

Der Einbau von Homocitrullin in Epitop **47** dagegen führt nicht zum Verlust der biologischen Aktivität, auch wenn sich die Absorptionswerte etwa halbieren. Die Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper sind also noch ausreichend vorhanden, aber schlechter ausgebildet als bei Citrullin in Position 7 (Peptid **1**) mit einer Methylengruppe in der Seitenkette weniger. Der verwendete anti-CCP-Antikörper unterscheidet also offensichtlich zwischen Cit- und Hci-enthaltenden Peptiden, dennoch besteht eine Kreuzreaktivität zwischen den beiden Aminosäure-Haptenen. Der Autoantikörper, der sich gegen homocitrullinierte Antigene richtet, wird als anti-CarP-Antikörper (*carbamylated protein*, vgl. Einleitung 1.4) bezeichnet.^[120] Bisherige Studien beschreiben sowohl CCP-positive wie auch CCP-negative Patienten, die den anti-CarP-Antikörper im Blutserum enthalten.^[120,121] Besonders interessant für eine verbesserte Sensitivität der diagnostischen Tests sind also diejenigen Patienten mit der Kombination CCP-/CarP+. Über dies hinaus wurde aber nicht beschrieben, inwiefern anti-CCP-Antikörper auch homocitrullinierte Peptide erkennen. Die vorliegenden Daten weisen jedenfalls auf diesen Zusammenhang hin.

Die Präsentation unterschiedlich langer Harnstoff-Haptene auf einem konformationell definierten Gerüst hat die essentielle Rolle des Citrullins untermauert und wichtige Details der Antikörperbindung zutage gefördert. ELISA-Tests oder eine Affinitätschromatographie RA-betroffener Patientenseren mit diesen Peptidantigenen könnten weitere Autoantikörper gegen speziell diese Haptene identifizieren. In diesem Zusammenhang stellt sich ebenfalls die Frage, ob die kürzeren Homologen Aub (**48**) und Alb (**49**) bei Peptiden/Proteinen in Patientenseren auftauchen. Das Hci-Derivat **47** stellt vor allem im Vergleich zu bereits publizierten Peptid-/Proteinfragmenten, bei denen aus Lysin durch Carbamylierung Homocitrullin gewonnen wurde, ein interessantes serologisches Ziel dar. Weitergehende Tests mit Blutseren von RA-Patienten könnten dementsprechend durchgeführt werden.

3.15 Ansätze zu einer personalisierten RA-Diagnostik

Das beschriebene modulare Design der β -*hairpin*-Epitope erweitert nicht nur das chemisch-synthetische Modifikationsspektrum, sondern nähert sich auch einer Antwort auf die Frage, was ein solches Peptid überhaupt zu einem (konformationellen) Epitop macht und welche Faktoren dafür ausschlaggebend sind. Entscheidend ist dabei die Korrelation zwischen der räumlichen Struktur und der biologischen Aktivität. Der bisher gewählte Ansatz der zufälligen Variation von Primärstrukturen sucht nach einer eindimensionalen Lösung (Positionsmutationen und entsprechende Scan-Verfahren) für ein dreidimensionales Problem.^[10] Trotz der Erforschung

vieler citrullinierter Proteinfragmente ist eine deutliche Verbesserung der diagnostischen Sensitivität (bisher etwa 70%)^[91,109] nicht erzielt worden.

Mit den formstabilen *hairpin*-Gerüsten soll eine Zusammenstellung an Peptiden gefunden werden, die die RA-Autoantikörper über die Epitopkonformation komplementär zueinander definieren. Abbildung 3.80 verdeutlicht das Prinzip anhand eines angepassten RAMACHANDRAN-Plots. Einem „Schiffe-Versenken-Spiel“ ähnlich sind die verschiedenen Autoantikörper (rechteckige Kästen) über den Plot verteilt und stimmen so mit einem für die Erkennung notwendigen Satz an ϕ - und ψ -Winkeln überein. Die Gesamtheit aller dieser Paratope entspricht dem Profil eines Patienten.

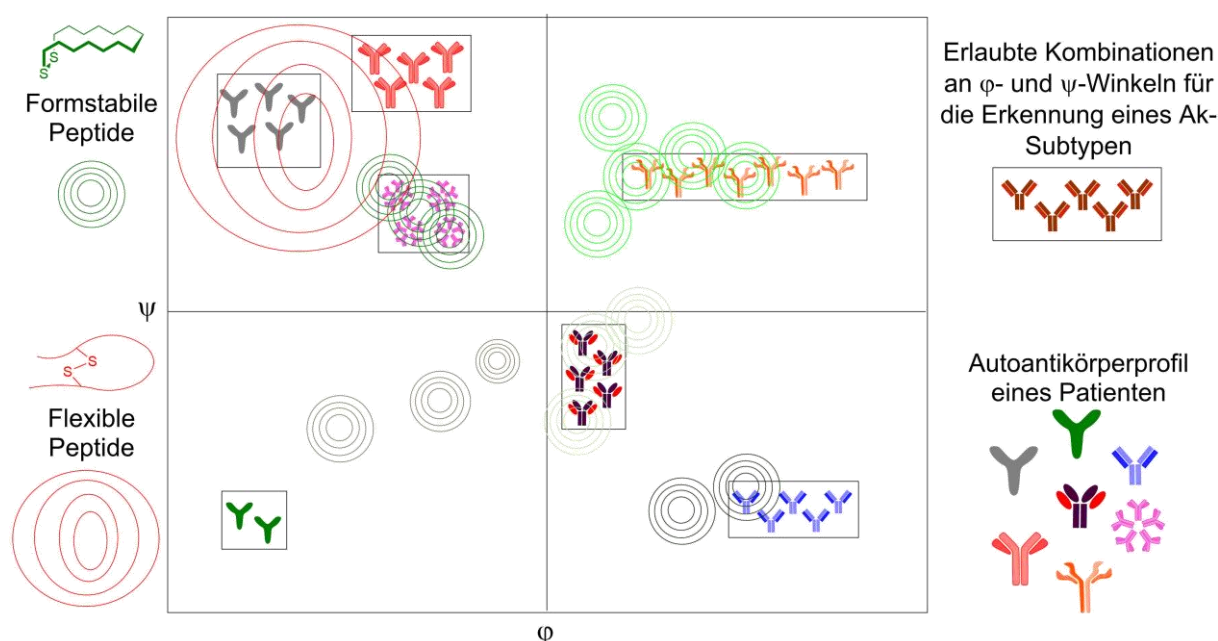


Abbildung 3.80. Modifizierter RAMACHANDRAN-Plot für die Darstellung des konformationellen Raums der Epitop-Paratop-Erkennung.

Formstabile Peptide (grüne Höhenlinien) haben einen klar definierten konformationellen Raum, der mittels des modularen Designs genau festgelegt werden kann. Dadurch wird der molekulare Erkennungsprozess Richtung Schlüssel-Schloss-Erkennung^[350] dirigiert und ungewöhnliche Plotbereiche werden adressierbar. Flexible Peptide (rote Höhenlinien), die lediglich in ihrer Aminosäuresequenz positionsweise verändert werden, führen zwar zu einem verhältnismäßig größeren Areal an abgedeckten ϕ - und ψ -Winkeln und können durch einen *induced fit*^[351] bzw. eine *conformational selection*^[352] auch an verschiedene Antikörper binden (siehe auch Kapitel 1.1 zum Thema Antikörperpromiskuität). Die Kombinationsvielfalt dieser Winkel bleibt im Rahmen dieser Bindungsmodi jedoch zu stark eingeschränkt, um

Autoantikörper mit unentdecktem konformationellen Raum zu identifizieren, da die tatsächlich gebundene Konformation unbekannt bleibt und eine Korrelation der Affinität dementsprechend nur zur Primärsequenz besteht. Ziel ist es also, den konformationellen Raum der Epitop-Paratop-Erkennung zu kartieren und diesen Ansatz in Richtung einer personalisierten Diagnostik zu lenken.

Die Entwicklung der serologischen Tests mit formstabilen Epitopen, bestehend aus dem Filaggrinfragment **cfc1-cyc** und dem damit kombinierten COCHRAN-Cluster, begann mit der Arbeit von SABRINA FISCHER. Mit dieser ersten Generation war sie in der Lage, einen menschlichen anti-CCP-Antikörper von einem Hasen-Antikörper zu unterscheiden, der durch Immunisierung mit CCPs gewonnen wurde (siehe Abbildung 3.81).^[272] Ein Hase besitzt dabei ein Antikörperprofil, das nicht mit demjenigen eines Menschen überlappt. In der vorliegenden Arbeit konnten durch die Verwendung eines korrelierten Designs von zwei D-Aminosäuren konformationelle Epitope mit ungewöhnlichen β -*hairpin*-Strukturen synthetisiert werden, die verschiedene humane RA-Autoantikörper, nämlich anti-CCP und anti-Sa, differenzieren konnten (siehe Kapitel 3.5).^[289] Die beiden genannten Autoantikörper stellen Untergruppen aller gebildeter RA-Paratope (Abbildung 3.81 Mitte) dar, die nicht direkt charakterisiert werden können, sondern eben durch die verwendeten konformationellen Peptidepitope indirekt in ELISA-Tests definiert werden. Gleichzeitig sind sie somit Teil des Autoantikörperprofils eines RA-Patienten, das sich also ebenso durch Immuntests mit den selektiven Peptidantigenen repräsentieren lässt (Abbildung 3.81 unten). Nur die Kombination an Signalen, die der ausgewählte, klar definierte Satz an Peptiden und Konformationen im ELISA ergibt, und nicht der Absorptionswert einer einzelnen Spezies führen zu einer detaillierten Aussage über die Antikörperzusammensetzung und ermöglichen sinnvolle Vergleiche. Mit dem erstellten Affinitätsmuster (Absorptionsmuster im ELISA), ähnlich einem Barcode, können auch bisher unerkannte und überlappende Profile identifiziert werden.

Es geht also nicht um die 'Verbesserung' der biologischen Aktivität bestehender Antigene, sondern um die Entwicklung und das Design zueinander komplementärer Epitopkonformationen. Auf dem beschriebenen Weg soll ein Beitrag zu einer sensitiveren Diagnostik geleistet werden, hin zur personalisierten Aussage über Art und Menge im Blutserum enthaltener Antikörper.

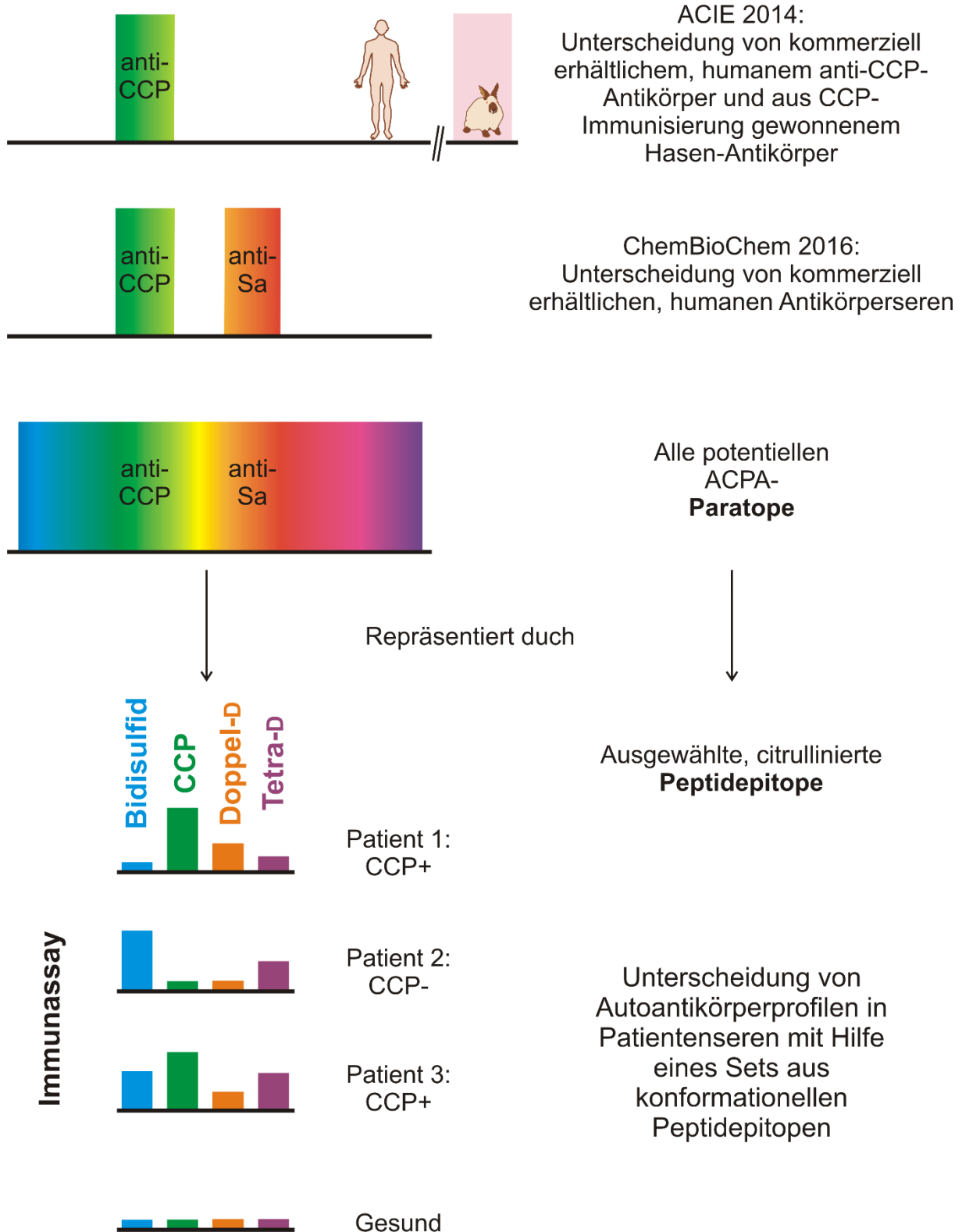


Abbildung 3.81. In bisherigen Arbeiten konnten menschliche von Hasen-Antikörpern^[272] sowie menschliche RA-Autoantikörper untereinander (anti-CCP und anti-Sa)^[289] unterschieden werden (oben). Dabei stellen anti-CCP- und anti-Sa-Antikörper nur eine Untergruppe aller während des Krankheitsverlaufs auftretenden Antikörper dar. Sie können nicht einfach direkt charakterisiert werden, sondern werden indirekt durch ihre konformationellen Peptidantigene in Immunassays charakterisiert.

3.15.1 Auswahl der Peptid epitope für ELISA-Tests mit Blutseren

Auf der Basis aller geleisteten Vorarbeiten können Peptid epitope mit unterschiedlichsten konformationellen Eigenschaften ausgewählt und in ELISA-Assays gegen Blutseren getestet werden. Die Peptid auswahl erfolgte unter dem Kriterium von definierten, ungewöhnlichen Konformationen, die in den bisherigen ELISA-Tests gegen die Positivkontrollseren (anti-CCP und teilweise anti-Sa) der Firma *Euroimmun* (Lübeck) vielversprechende Ergebnisse zeigten. *Random coil*-Strukturen werden nicht berücksichtigt, da keine direkte Korrelation zwischen Konformation und Affinität möglich ist. Im Besonderen die Gruppe der Mono-, Doppel- und Tetra-D-Epitope (Kapitel 3.5 und 3.6) wies eine Vielzahl von verschiedenen Absorptionswerten und -mustern im Vergleich zueinander auf. Dabei sind Spezies, die im Vortest inaktiv oder wenig aktiv waren, sogar besonders nützlich, da sie ja gerade durch den in kommerziellen Tests verwendeten anti-CCP-Antikörper nicht erkannt werden, dafür aber möglicherweise andere Paratope im Patientenblut. Die Wahl fiel auf das all-L-Referenzepitop **1**, die beiden Mono-D-Varianten **9** (t6) und **11** (r9), die Doppel-D-Mutanten **10** (t6,r9) und **12** (s5,s10), das Tetra-D-Peptid **14** (t6,r9,s5,s10) sowie das Doppel-D-Bidisulfid **21** (C1-C14,c5-c10). Der Vorteil der D-Aminosäure-enthaltenden β -*hairpins* liegt, wie beschrieben, in der ausschließlichen Veränderung der Konformation unter Beibehalt der chemischen Funktionalität. Nur Epitop **21** besitzt mit dem zweiten Disulfid (anstelle der Serine in Position 5 und 10) eine Modifikation der chemischen Funktionalität, die gleichzeitig eine konformationell eingeschränkere Variante von **12** (s5,s10) darstellt. Außerdem waren einige der Derivate in der Lage, anti-CCP- und anti-Sa-Autoantikörper in ELISA-Tests auf Grundlage der gemessenen Absorptionswerte zu unterscheiden (siehe Kapitel 3.5). Eine ideale Voraussetzung für den Einsatz in den Tests mit Blutseren.

Eine detaillierte Beschreibung der konformationellen Eigenschaften aller verwendeten Peptide findet sich in den jeweiligen Kapiteln 3.5 und 3.6 wieder. Um die entsprechenden Parameter übersichtlich zu vergleichen und nochmals in ihrer Gesamtheit zu erfassen, sind in Abbildung 3.82 nochmals die Amid-Protonen- und Leucin-H δ -Ausschnitte gezeigt. Hervorgehoben ist der Verlauf der Tieffeldverschiebung des E4-NHs, der gut mit der Hochfeldverschiebung des L12-H δ^h korreliert. Gleichzeitig kann an diesen beiden Parametern alleine nicht die Faltungspopulation der jeweiligen Spezies festgemacht werden, denn trotz unterschiedlicher Hoch- und Tieffeldverschiebungswerte weisen alle Peptide, mit Ausnahme des Mono-D-*hairpins* **9** mit mittelgroßen Werten, eine hohe Dispersion im amidischen Bereich auf. Die Hochfeldverschiebung des R9/r9-NHs, die nur bei Vorhandensein eines intakten *turns* und

damit eines gefalteten β -hairpins auftritt, steht stellvertretend als wichtiges Indiz für das Vorliegen einer Vorzugskonformation in Lösung.

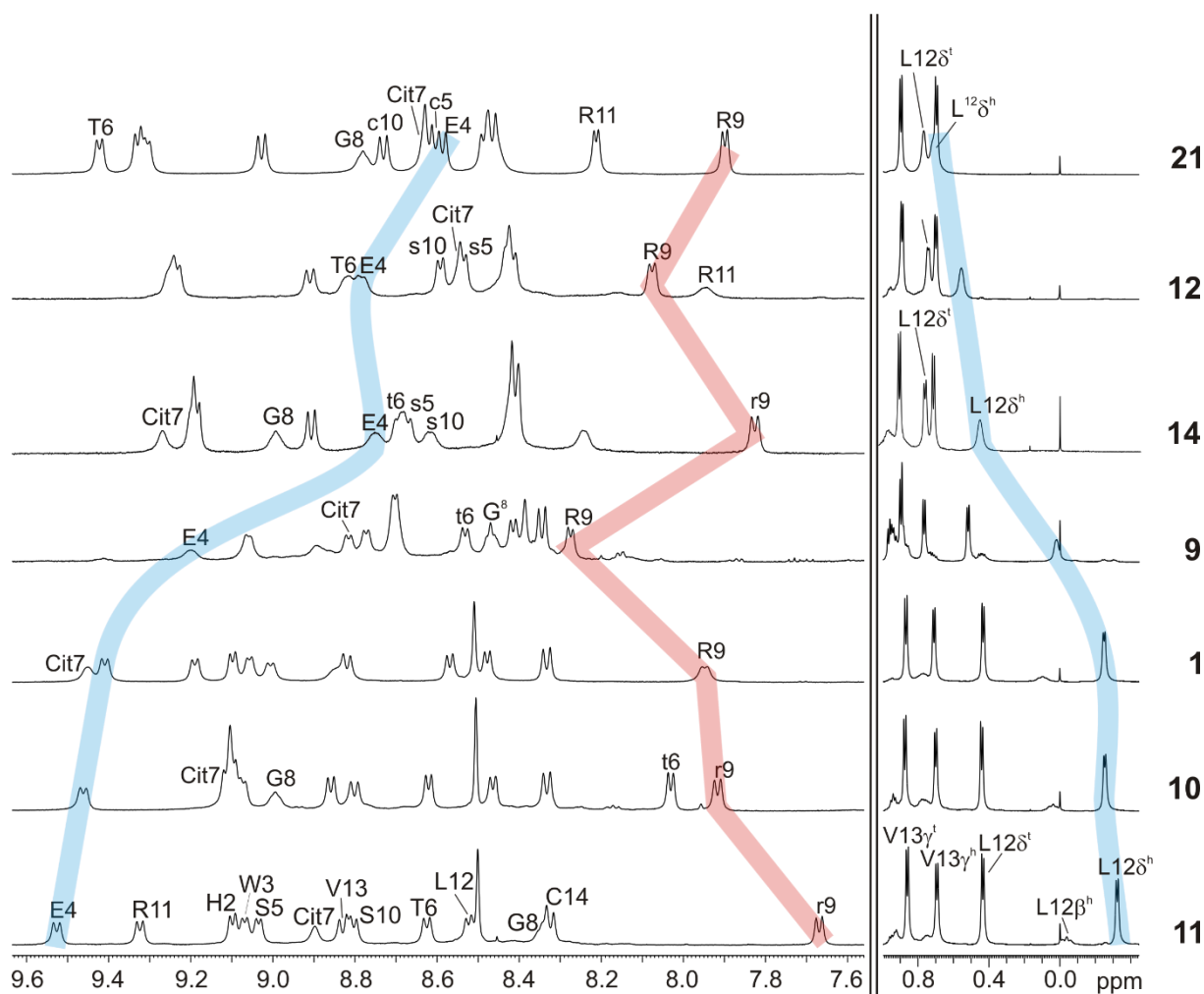


Abbildung 3.82. Amidischer und Alkylbereich der ^1H -NMR-Spektren der Peptidpitope **1**, **9** bis **12**, **14** und **21** (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D₂O 9:1). Die Spektren sind von hoher zu niedriger Leu-H δ -Dispersion bzw. E4-NH-Tieffeldverschiebung geordnet (blau unterlegt). Diese beiden Werte korrelieren gut miteinander und liefern Informationen über die Beschaffenheit des hydrophoben Clusters, stimmen aber nicht generell mit einer hohen bzw. niedrigen Faltungspopulation überein, wie bspw. der Vergleich mit der Hochfeldverschiebung des R9/r9-NH (rot hinterlegt) anzeigt.

Zusammenfassend kann also folgende Aussage getroffen werden: Die Entschirmung des E4-NH und die L12-H δ -Hochfeldverschiebung spiegeln die Beschaffenheit des hydrophoben Clusters wider, liefern aber keine allgemeingültige Aussage über die Formstabilität der Peptidkonformation. Eine hohe Dispersion und Hochfeldverschiebung von L12-H δ sowie eine intensive Tieffeldverschiebung von E4-NH sind immer auch ein Hinweis auf eine hohe

Faltungspopulation, eine geringe Ausprägung dieser Messgrößen lässt jedoch nicht automatisch den umgekehrten Schluss zu.

Alle spektroskopischen Details, im Besonderen auch 2D-NMR-Spektren, konnten über dies hinaus in NMR-basierte Strukturen umgesetzt werden. 3J -Kopplungskonstanten und NOEs quantifizieren dabei Seitenkettenrotamere um χ_1 -Winkel für alle Aminosäuren. Vier dieser Strukturen, nämlich die Epitope **1** (all-L), **10** (t6,r9), **12** (s5,s10) und **14** (t6,r9,s5,s10) sind in Abbildung 3.83 in überlagerter Darstellung einzusehen. Sie unterstreichen den rechtwinkligen Knick, der durch die Doppel-D-Aminosäuren hervorgerufen wird, und dessen Einfluss auf die konformationellen Eigenschaften der β -hairpin-Epitope. Sie repräsentieren sowohl Mono- als auch Bidisulfide. Der terminal positionierte hydrophobe Cluster verhält sich ähnlich bis gleich unter allen Spezies. Die *turn*-Region mit dem darin enthaltenen Citrullin dagegen nimmt verschieden gewinkelte Geometrien ein. Gleichzeitig ist die rechtsgängige Verdrillung des *backbones* in diesen Darstellungen gut erkennbar.

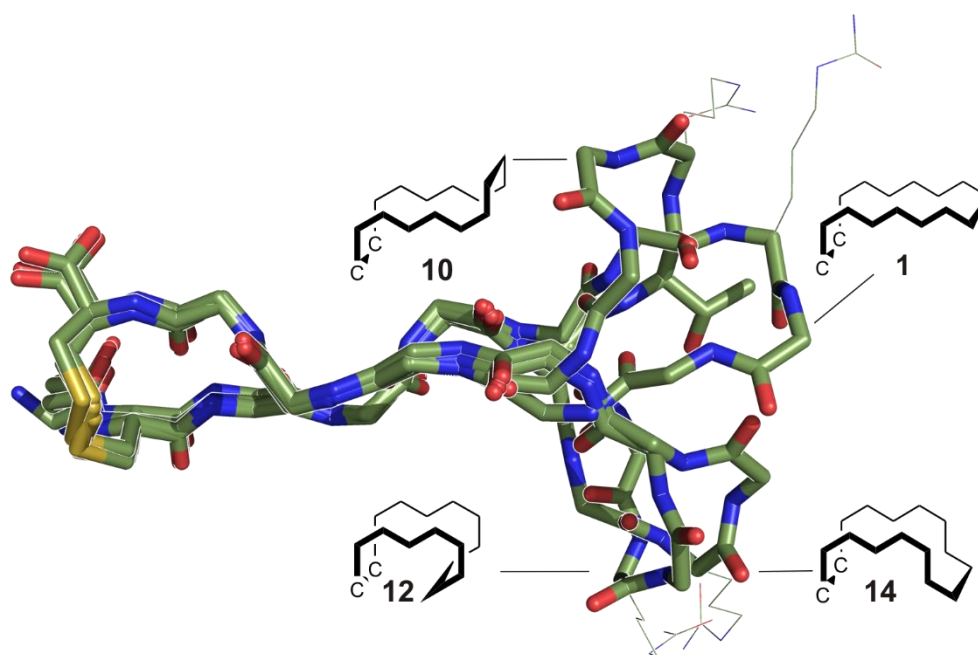


Abbildung 3.83. NMR-basierte Computer-Modelle der Peptide **1** (all-L), **10** (t6,r9), **12** (s5,s10) und **14** (t6,r9,s5,s10). Die Strukturen sind überlagert. Die hydrophoben Cluster unterscheiden sich nur minimal, während die *turns*, die das Hapten Citrullin (dargestellt als dünnere Linien) unterschiedliche verdrillte und geknickte Geometrien, basierend auf ihrem Gehalt an D-Aminosäurepaaren, einnehmen. Vereinfachte Zickzack-Strukturen befinden sich am *turn* des jeweiligen Peptids.

3.15.2 ELISA-Tests mit Blutseren

Die Blutseren wurden vom Rheumazentrum Mittelhessen in Bad Endbach zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Seren von Patienten mit pathologischem RA-Befund, von denen die eine Hälfte in kommerziellen Tests seropositiv, die andere Hälfte seronegativ auf den anti-CCP-Antikörper getestet wurden. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Probanden. Die Proben wurden in der *Comprehensive Biobank Marburg* gelagert und verwaltet. In den vorliegenden Tests sollte deren generelle Machbarkeit und Reproduzierbarkeit in unseren Händen und unter Laborbedingungen festgestellt werden.

Die Ergebnisse der ELISA-Tests der Kontrollgruppe (sechs Probanden) finden sich im Anhang (Kapitel 8.13 wieder), diejenigen der tatsächlichen RA-Patienten in Abbildung 3.84 (sechs CCP-positive RA-Patienten) und 3.85 (sechs CCP-negative RA-Patienten) einzusehen. Die Nummern der Blutseren entsprechen denen durch die *Comprehensive Biobank Marburg* vorgegebenen Projektnummern. Alle Kontrollseren liefern sehr geringe absolute Absorptionswerte und damit die wichtige Aussage, dass keine falsch positiven Aussagen erzielt wurden. Die besten Antigene im CCP-Test, nämlich **1** und **11** (was sich sowohl in den Vortests als auch später bei den CCP+ Patienten bestätigte), zeigen hier maximale absolute Absorptionswerte von 0.40 an. Ein genauer Grenzwert für ein tatsächlich negatives Ergebnis müsste anhand vieler Testreihen bestimmt werden, aber die hier gemessenen Daten liefern einen guten Anhaltspunkt, da sie sich von Serum zu Serum kaum unterscheiden. Mit diesem Wissen lassen sich die Ergebnisse mit den tatsächlichen RA-Patienten bewerten und einordnen. Das Bidisulfid **21** erweist sich für die Kontrollgruppe als auffälligstes Antigen, da es bei fast allen Seren der Kontrollgruppe die verhältnismäßig höchsten Absorptionswerte aufweist. Es besteht das Potential, das Epitop in eine Richtung zu optimieren, die im Zusammenspiel mit den geringen gemessenen Werten der anderen eingesetzten Peptide die Abwesenheit von RA-Autoantikörpern anzeigen könnte.

Die ELISA-Tests der Peptidantigene gegen die CCP-positiven Patienten sind in Abbildung 3.84 einzusehen und zeigen unterschiedlichste Muster für jedes Serum in Bezug auf die verwendeten Peptide an. Damit bestätigt sich auf den ersten Überblick, dass ein definierter Satz an Peptiden Unterschiede in Profilen aufdecken kann, wohingegen ein einzelnes Peptid maximal eine Aussage über verschiedene Autoantikörper-Titer liefert. Das Referenzpeptid **1** (all-L, transparent blauer Balken) zeigt, wie aus den Vortests zu erwarten, immer eine hohe Absorption von etwa 2.50 oder höher. Das Gleiche gilt für das Mono-D-Peptid **11** (r9, gelber Balken). Zeigen diese beiden, auch konformationell sehr ähnlichen Peptide einen hohen Absorptionswert

an, kann die Anwesenheit von anti-CCP-Antikörpern mit Sicherheit festgestellt werden. Somit wäre eine frühzeitige Diagnose gesichert.

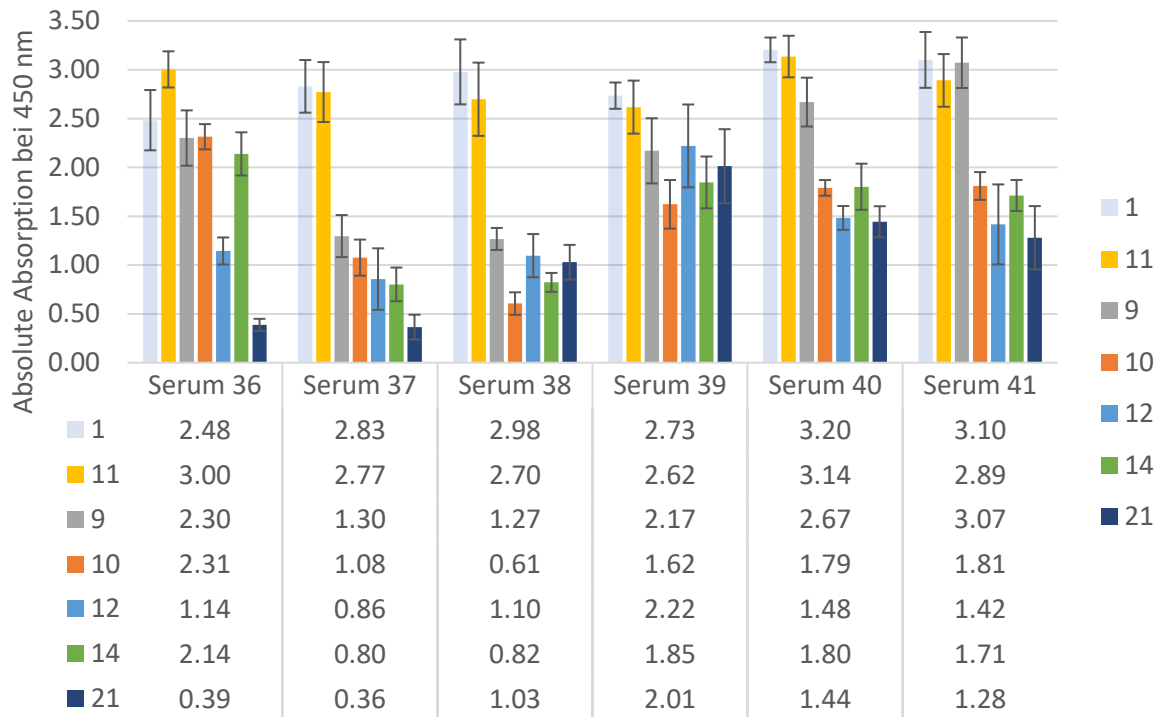


Abbildung 3.84. Ergebnisse der ELISA-Tests der Peptidepitope **1**, **9-12**, **14** und **21** gegen Blutseren der CCP-positiven RA-Patienten.

Eine solche Aussage kann aber auch mit bestehenden Tests und deren Sequenzen bereits getätigt werden. Von Bedeutung sind deshalb vor allem die weiteren verwendeten Peptide und welche Affinitäten sie in Relation zu den genannten Epitopen **1** (all-L) und **11** (r9) aufweisen. Das zweite Mono-D-Peptidantigen **9** (t6, grauer Balken) korreliert nicht immer proportional mit **1** und **11**, nimmt aber generell mittlere bis hohe Absorptionswerte an. Obwohl Epitop **9** eine ähnliche Konformation in Lösung annimmt wie die beiden genannten Peptide, scheint entweder die Bindung an die gleichen Paratope etwas schwächer ausgeprägt zu sein (was auch schon bei den Vortests gegen die kommerziell erhältlichen Seren vermutet werden kann) oder es werden andere Antikörpersubtypen gebunden. Letzteres kann durch die unterschiedlichen Absorptionsverhältnisse im Vergleich zu den besten Bindern je Blutserum bewiesen werden. Zum Beispiel beträgt das Absorptionsverhältnis des Epitoppaars **1/9** für Serum 36 etwa 1:1, während es für Serum 38 annähernd 1:3 annimmt. Gleichzeitig ergibt das Verhältnis der besten Binder **1/11** immer 1:1.

Doppel-D-Mutante **10** (t6,r9, oranger Balken) erweist sich als schwacher bis durchschnittlicher Binder mit variierendem Mustern (Serum 38 enthält bspw. keine Antikörper, die dieses Epitop erkennen, Serum 36 jedoch viele). Ähnlich verhält es sich sowohl mit dem Doppel-D-*hairpin* **12** (s5,s10, blauer Balken), welches weniger affin gegenüber Serum 36, dafür höherer Absorptionswert bei Serum 38 aufweist, als auch mit dem Tetra-D-Peptid **14** (t6,r9,s5,s10, grüner Balken). Anders verhält sich dagegen Bidisulfid-Epitop **21** (c5,c10, lila Balken): Während die Seren 36 und 37 keine Paratope enthalten, die dieses Peptid binden, werden im Falle der anderen Seren 38 bis 41 mittlere Affinitäten gemessen.

Zwar besitzt jedes Blutserum im Detail sein ganz individuelles Profil, annäherungsweise lassen sich die sechs Patienten aber in vier Unterkategorien einteilen: Serum 37 und 38 zeigen hohe Absorptionswerte nur gegenüber den besten anti-CCP-Bindern **1** und **11** (r9), Serum 40 und 41 zusätzlich noch gegenüber Mono-D-Derivat **9** (t6). Serum 36 besitzt darüber hinaus einen hohen Anteil an Autoantikörpern, die die Doppel-D-Peptide **10** (t6,r9) sowie **12** (s5,s10, etwas weniger) und das Tetra-D-Derivat **14** (t6,r9,s5,s10) binden. Serum 39 beinhaltet Paratope gegen alle eingesetzten Epitope in relevanten Mengen.

Die citrullinierten Doppel-D-, Tetra- und Bidisulfid-Epitope und die variantenreichen Profile weisen eindeutig darauf hin, dass in den Blutseren noch andere RA-assoziierte Immunglobuline enthalten sein müssen als der anti-CCP-Antikörper. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass die Absorptionsverhältnisse zwischen allen Spezies und im Besonderen in Relation zu den besten anti-CCP-Bindern **1** und **11** ansonsten immer den gleichen Wert annehmen müssten. So könnten nur Unterschiede im Antikörpertiter festgestellt werden (anhand kalibrierter Absolutwerte). Da dies nicht der Fall ist, verdeutlicht der ausgewählte Satz an Peptidepitopen, dass mit dieser Methodik der korrelierten und komplementären Konformationen viel gezielter nach Profilen und Unterschieden gesucht werden kann als es mit randomisierten Primärsequenzen der Fall ist. Er liefert einen wichtigen Hinweis auf bisher unerkannte Autoantikörper, die bspw. über Affinitätschromatographie aus den Seren gewonnen werden könnten. Idealerweise handelt es sich um IgGs, die in CCP-negativ getesteten RA-Patienten auftreten, und somit die Sensitivität der RA-Diagnostik erhöhen.

Durch den Krankheitsverlauf der RA ist es wahrscheinlich, dass Patienten, bei denen bspw. anti-CCP-Antikörper im Blut gefunden wurden (CCP+), auch eine Vielzahl anderer ACPAs ausbilden, die detektiert werden können (vgl. Einleitung 1.4). Das haben die Tests mit solchen Blutseren in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Für eine verbesserte diagnostische Sensitivität sind im Besonderen die CCP-negativen RA-Patienten von Bedeutung, da in diesem Fall zum anti-CCP-Antikörper komplementäre diagnostische Marker gesucht werden, die in möglichst

vielen betroffenen Individuen auftreten. Abbildung 3.85 präsentiert die Ergebnisse der zuvor verwendeten Zusammenstellung an Peptiden gegenüber solchen CCP-negativen Patienten. Insgesamt ergibt sich hier ein Bild mit geringen gemessenen Absorptionen, allerdings sind die Werte zumindest für Serum 48, 49 und 63 deutlich höher (bis zu 1.00, einzelne Epitope auch mehr) als bei den Kontrollseren (Anhang 8.13). Generell gibt es keine falsch positiven Ergebnisse im Vergleich zum externen kommerziellen Test. In diesem Zusammenhang zeigt kein Serum CCP-positive Ergebnisse an oder ähnelt auch nur annähernd einem der bereits getesteten CCP-positiven Patientenseren (Abbildung 3.84).

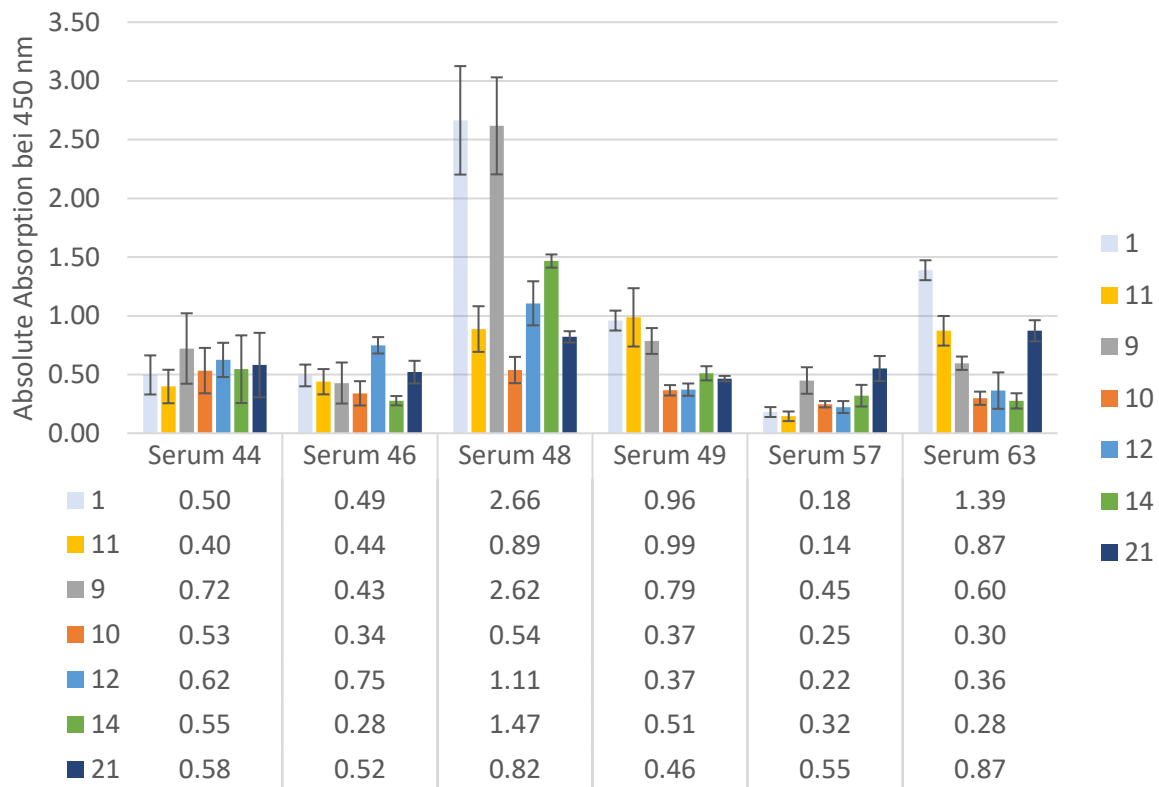


Abbildung 3.85. Ergebnisse der ELISA-Tests der Peptidepitope **1**, **9-12**, **14** und **21** gegen Blutseren der CCP-negativen RA-Patienten.

Serum 48 sticht im Besonderen hervor und ist ein erster Treffer: Das all-L-Epitop **1** und das Mono-D-Epitop **9** (t6) weisen hier Absorptionswerte um 2.50 auf, was in dieser Kombination für keinen CCP-positiven Patienten. Dort zeigt in allen Fällen eine Kombination aus hohen Affinitäten für die Epitope **1** und **11** das Vorliegen der entsprechenden Paratope an. Auch Tetra-D-Peptid **14** demonstriert für Serum 48 eine mittelhohe Absorption mit 1.47 an. Serum 63 belegt nur für Peptidantigen **1** einen mehr oder weniger auffälligen Absorptionswert von 1.39 auf. Für

statistisch relevante Ergebnisse müssen jedoch weitere Tests mit deutlich mehr CCP-negativen Blutseren durchgeführt werden.

Die vorliegenden Tests mit Blutseren haben erste vielversprechende Hinweise geliefert, dass der Ansatz einer ausgewählten Zusammenstellung an konformationellen Peptidepitopen, die sich sowohl in ihrer räumlichen Struktur als auch in ihrer biologischen Aktivität komplementär zueinander verhalten, zu ersten Erfolgen führt. Zwei hochaktive, in ihrer Affinität überlappende CCP-Antigene (**1** und **11**) diagnostizieren das Vorliegen von anti-CCP-Antikörpern. Verhält sich eines der beiden Antigene anders (wie für Serum 48 beobachtet) liegen höchstwahrscheinlich andere Paratope vor. Die D-Aminosäure-modifizierten Peptidepitope identifizieren verschiedene oder zumindest nicht-überlappende Antikörpersubtypen, jedoch nur in Kombination miteinander und vor allem im Vergleich zum gerade erwähnten Epitoppaar **1** und **11**. Ein erster (statistisch nicht relevanter) Treffer konnte für ein CCP-negatives Serum erzielt werden. Auch hier ist die Information im direkten Vergleich mit allen Antigenen und den verschiedenen Patientengruppen besonders wertvoll und aussagekräftig.

3.15.3 Der Ethikantrag

Bevor mit den Blutseren gearbeitet werden durfte, musste ein Ethikantrag gestellt werden. Dies ist notwendig, damit ethische, medizinisch-wissenschaftliche und rechtliche Aspekte abgeklärt werden und der Umgang mit den in dieser Arbeit verwendeten, menschlichen Körpermaterialien überhaupt erlaubt ist. Der Antrag wurde mit dem Titel „Pilotstudie zur diagnostischen Eignung neuer konformativ fixierter Peptide/Peptidmimetika als Antigene zum Antikörpernachweis in ELISA-Testsystemen bei Rheumatoider Arthritis“ bei der *Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg* zur Begutachtung eingereicht. Der in diesem Fall achtseitige Antrag enthält Informationen über die Verantwortlichen der Studie, den Stand der Forschung, die Methodik, das Studiendesign, Patienten-/Probandenzahl und Rekrutierung sowie potentielle Risiken und Aufklärung der Patienten. Er wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Dr. PETRA INA PFEFFERLE, die die *Comprehensive Biobank Marburg* leitet, und Frau DÖRTE BRÖDJE als Koordinatorin aus der Medizin erarbeitet und niedergeschrieben. Die statistischen Daten, also welche Anzahl an Peptiden und Probanden sinnvolle, statistisch relevante Ergebnisse liefern, wurden von Frau Prof. Dr. NINA TIMMESFELD bereitgestellt. Als Ansprechpartnerinnen in Rheumazentrum Mittelhessen in Bad Endbach standen Frau Dr. SUSANNE AMANN und Frau KATRIN STORCK-MÜLLER zur Verfügung. Der Antrag erhielt nach zweimaligem Einreichen mit Überarbeitung ein positives Votum.

3.16 Weitere hairpin-Designelemente

3.16.1 Korrelierte β -Aminosäuren

Das Einbringen von korreliert gegenüberliegenden Aminosäurebausteinen in β -hairpin-Strukturen wurde bereits mit verschiedenen anderen Modifikationen (unter anderem D-Aminosäuren, Disulfide, Deletion) durchgeführt. In diesem Fall werden β -Aminosäuren eingesetzt, also solche Aminosäuren, die die Aminofunktion am β -Kohlenstoff tragen und nicht, wie ihre natürlich vorkommenden α -Pendants, am α -Kohlenstoff. Durch die zusätzliche Methylengruppe ist im *backbone* eine zusätzliche C-C- σ -Bindung enthalten, welche es flexibler macht.^[353] Nichtsdestotrotz bilden β -Peptide bevorzugte Lösungskonformationen aus, im Besonderen helixartige Strukturen.^[353–355] Auch heterogene α/β -Peptide (also solche, die sowohl α - als auch β -Aminosäuren enthalten) sind mit einer Vielzahl von Faltungsmustern bekannt,^[356] darunter β -hairpin-Strukturen.^[357,358]

In diese Kategorie fallen damit auch die hier synthetisierten 14er-hairpins, wobei überprüft werden sollte, ob die Sekundärstruktur erhalten bleibt, wenn β -Alanin (also eine β -Aminosäure ohne Seitenkette) in direkt gegenüberliegenden hairpin-Positionen eingebracht wird (Abbildung 3.86). Dabei wurden sowohl H-Brücken-Positionen als auch nicht-H-Brücken-Positionen des hairpins adressiert. Abschließend sollte die biologische Aktivität gegenüber anti-CCP-Antikörpern evaluiert werden.

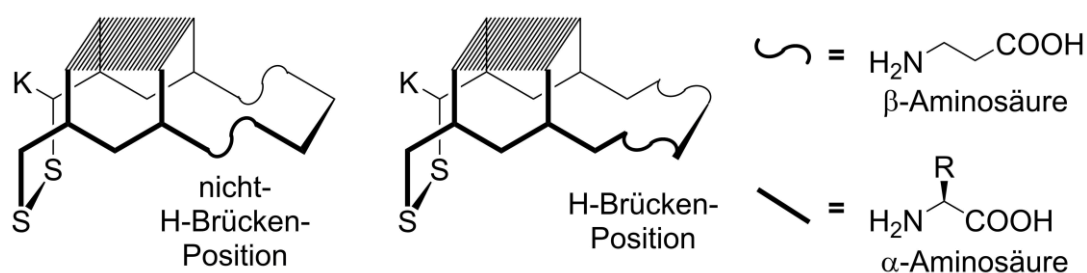


Abbildung 3.86. Einbau von β -Aminosäuren (in diesem Fall β -Ala) in den ursprünglichen all- α -Aminosäure-hairpin, der durch den hydrophoben Cluster stabilisiert ist.

Nach erfolgreicher Synthese der Sequenzen $\text{K}^0\text{C}^1\text{HWE}\beta\text{A}^5\text{TCitGR}\beta\text{A}^{10}\text{RLVC}^{14}$ **50** und $\text{K}^0\text{C}^1\text{HWES}\beta\text{A}^6\text{CitG}\beta\text{A}^9\text{SRLVC}^{14}$ **51**, die auch für die β -Aminosäuren unter Standardkupplungsbedingungen stattfand (siehe experimenteller Teil), wurden NMR-Spektren aufgenommen. Der amidische Bereich der ^1H -NMR-Spektren ist in Abbildung 3.87 im Vergleich zu Referenzpeptid **1** abgebildet. Die hohe Dispersion beider β -Aminosäure-

enthaltender Spezies zeigt an, dass eine Vorzugskonformation in wässriger Lösung vorliegt und sich also auch hier das Konzept der korrelierten Mutation in *hairpins* für systematische Strukturmodifikationen bewährt. Die Gesamtdispersion nimmt bei den beiden Epitopen, auch im Vergleich zu **1**, etwa den selben Wert an, wobei im Fall von **50** (β A5, β A10) eine Abschirmung von E4-NH (9.18 ppm) und R9-NH (7.59 ppm) stattfindet. β A9 in **51** (β A6, β A9) nimmt den typischen hochfeldverschobenen Verschiebungswert der Aminosäure in *i*+3-Position ein (7.94 ppm), das *turn*-Register bleibt folglich intakt.

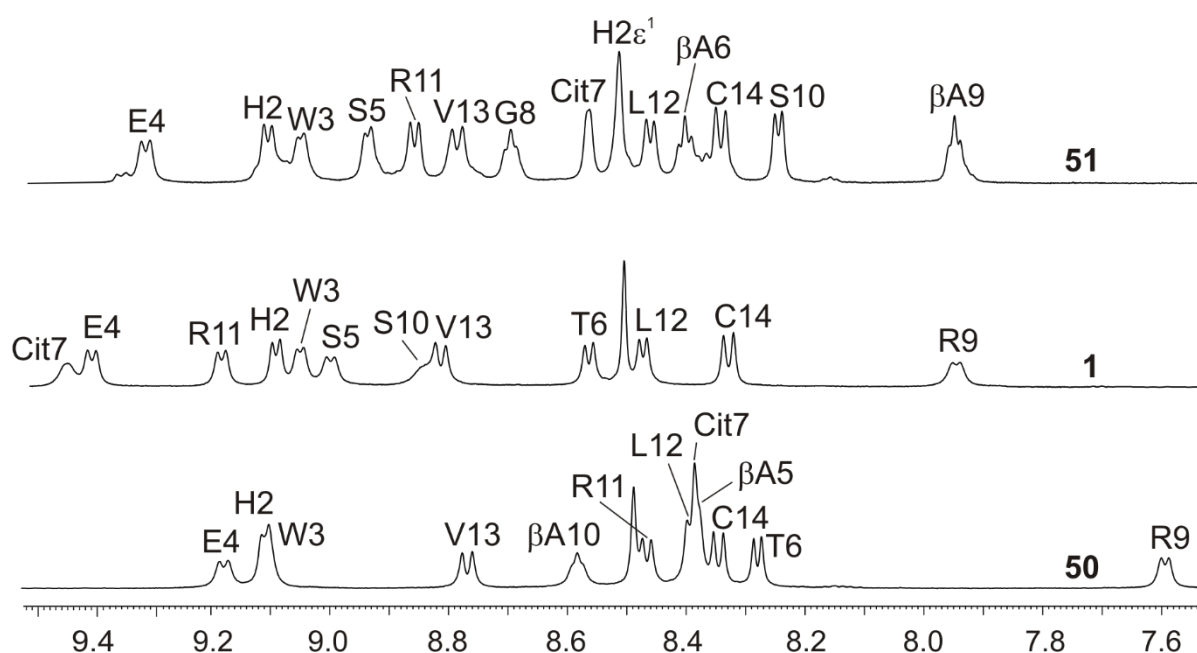


Abbildung 3.87. Amidische Bereiche der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D₂O 9:1) der Peptidepitope **1**, **50** (β A5, β A10) und **51** (β A6, β A9).

Die zentralen Aminosäuren des hydrophoben Clusters, H2, W3, L12, V13 sowie C14, zeigen sich wie zuvor von den Mutationen unbeeindruckt und weisen in allen Fällen ähnliche bis gleiche Verschiebungswerte auf. Sowohl die mutierten Positionen selbst als auch die direkte Nachbarschaft in den Positionen 5 bis 10 weist dagegen in jedem Peptid Veränderungen auf, was sich durch die deutlich geänderte chemische als auch konformationelle Umgebung erklären lässt. Dies betrifft dementsprechend auch das Hapten Citrullin. Nur für Peptid **51** (β A6, β A9) ist das G8-NH überhaupt zugänglich. Der konformationelle Austausch zwischen den *turn*-Typen muss hier verlangsamt sein, obwohl gerade die direkte Nachbarschaft von *i*+1 (Cit7) und *i*+2 (G8) mit den β -Aminosäuren etwas flexibler werden sollte. Die Daten weisen hier auf das Gegenteil und damit eine konservierte *turn*-Struktur hin.

Die neuen, ungewöhnlichen β -*hairpin*-Konformationen führten in den ELISA-Tests zu den in Abbildung 3.88 gezeigten Ergebnissen gegen anti-CCP-Antikörper. Epitop **50** (β A5, β A10) erhält die biologische Aktivität von Referenzpeptid **1** fast vollständig, während Peptidantigen **51** (β A6, β A9) inaktiv ist. In Letzterem scheint sowohl die chemische Umgebung als auch die räumliche Orientierung des *turns* mit dem Hapten Citrullin so geändert zu sein, dass eine Erkennung durch den Antikörper unmöglich wird. In den nicht-H-Brücken-Positionen 5 und 10 dagegen hat die konformationelle Änderung kaum Einfluss auf die Affinität. Die ursprünglichen Serine in Peptid **1** sind also nicht essentiell für die Antikörperbindung. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse der Derivate **50** und **51** untereinander sogar deutlicher als bei den Peptiden mit korrelierten Mutationen, bei denen zwei gegenüberliegende D-Mutationen sowohl in H-Brücken- als auch in nicht-H-Brücken-Position zumindest ähnliche Testergebnisse liefern (vgl. bspw. die Antigene **10** und **12**).

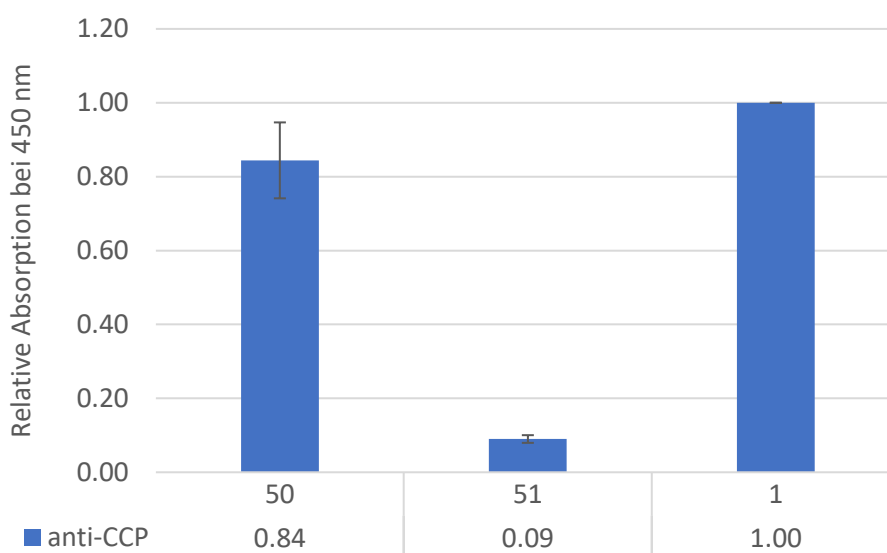


Abbildung 3.88. Gemessene Absorptionswerte der Epitope **50** (β A5, β A10) und **51** (β A6, β A9) in ELISA-Tests relativ zum besten Binder **1**.

Die generelle Machbarkeit der Synthese von formstabilen β -*hairpin*-Peptiden mit korrelierten β -Aminosäure-Paaren in H-Brücken- und nicht-H-Brücken-Position wurde damit bestätigt. Die bemerkenswerten Unterschiede in ihrer anti-CCP-Antikörperaffinität machen sie zu geeigneten Kandidaten für einen Test gegen Blutseren (hier insbesondere Epitop **51**). Natürlich könnten mit vorausgehender Synthese β -Aminosäuren in alle Positionen des *hairpins* eingebracht werden, um zu überprüfen, welchen Einfluss sie bspw. auf den hydrophoben Cluster haben oder ob ein β -Citrullin im *turn* noch erkannt würde.

3.16.2 Ribopyranosylierte Filaggrin-Peptide

Die Glykosylierung beschreibt eine wichtige posttranslationale Modifikation von Proteinen. Eine Zuckerfunktion lässt sich auch auf chemisch-synthetischem Wege auf geeignete Aminosäure-Seitenketten bringen, sodass glykosylierte Bausteine als β -hairpin-Designelemente verwendet werden können. In ihrer Doktorarbeit beschreibt ROMINA KIRSCHNER unter anderem die Synthese von Ribopyranose-modifiziertem Serin und Threonin.^[359] Diese Derivate wurden Fmoc-geschützt und anschließend in die Filaggrin-Sequenz **1** mutiert, und zwar dort, wo sich Serin oder Threonin befindet. Die Synthese der Sequenzen KCHWER**Rb**STCitGRR**Rb**SRLVC **52** (RbS: L-Riboserin) und KCHWES**Rb**TCitGRSRLVC **53** (RbT: L-Ribothreonin) erfolgte durch ROMINA KIRSCHNER selbst. Die Derivate wurden im Rahmen dieser Arbeit von mir auf ihre biologische Aktivität gegenüber anti-CCP-Antikörpern getestet. Piktogramme der Peptide samt ELISA-Ergebnisse sind in Abbildung 3.89 einzusehen. Die analytischen Daten zeigen, dass die β -hairpin-Konformation erhalten bleibt.^[359]

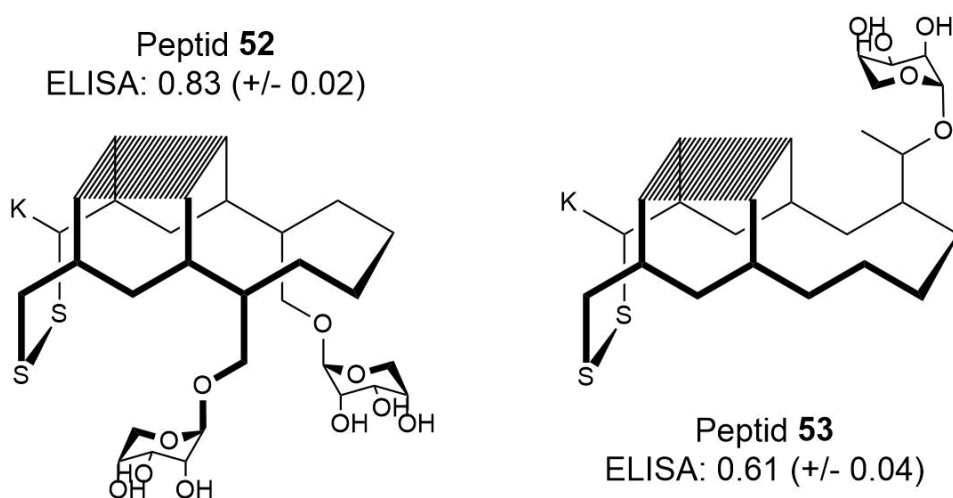


Abbildung 3.89. Ribopyranosylierte Peptidepitope **50** (RbS5, RbS10) und **51** (RbT6). Die Ergebnisse der ELISA-Tests sind relativ zu Referenzpeptid **1** angegeben (Absorption bei 450 nm).

Während Peptid **52** mit zwei gegenüberliegenden Riboserinen nur einen geringen Aktivitätsverlust im Vergleich zu Referenzepitop **1** aufweist, besitzt Peptidantigen **53** mit Ribothreonin in Position 6 nur 60% der ursprünglichen Aktivität. Die Ribose-funktionalisierten Serine in Position 5 und 10 haben also keinen großen Einfluss auf die Oberflächenwechselwirkung mit dem Autoantikörper. Die Aminosäuren in H-Brücken-Positionen, also diejenigen, die auf der gegenüberliegenden Seite der *backbone*-Ebene liegen,

haben eine größere Bedeutung für die Affinität. RbT6 in Peptid **53** befindet sich in einer solchen Position und befindet sich gleichzeitig in räumlicher Nähe zum Hapten Citrullin, was die schwächere biologische Aktivität dieses Peptids erklärt. Der Einfluss ist andererseits nicht so groß, dass die biologische Aktivität vollständig verloren geht. Ob es sich dabei um einen sterischen Effekt der Ribose handelt, oder ob der zusätzliche Zucker anderweitige Wechselwirkungen (bspw. mit dem Antikörper) eingeht, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Zur Klärung dieser Fragen könnten Aminosäuren mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten eingebracht werden. Darüber hinaus könnte die Einführung weiterer funktioneller Gruppen wie Sulfate oder Phosphate über die Hydroxy-tragenden Aminosäuren des β -hairpins weiteren Aufschluss auf den Bindungsmodus in der näheren Citrullinumgebung geben.

3.16.3 Hot=Tap als β -turn-Mimetikum

Der Einbau des *turn*-Mimetikums Hot=Tap (Hot: γ -Hydroxythreonin, Tap: 4-Thiaprolin; vgl. Einleitung 1.2)^[44] anstelle der CitG-Dipeptidsequenz in das 15er-Peptid K⁰C¹HWESTHot⁷=Tap⁸RSRLVC¹⁴ **54** erfolgte, um dessen konformationellen Einfluss auf das bereits formstabile β -hairpin-Gerüst mit seinem hydrophoben Cluster zu überprüfen (das Epitop ist aufgrund der Abwesenheit von Citrullin nachweislich inaktiv). So kann auch geklärt werden, welches der beiden Designelemente einen größeren Einfluss auf die Faltung hat und ob die starre, bicyclische Hot=Tap-Einheit mit der inhärenten Dynamik des β -hairpins korreliert. Abbildung 3.90 zeigt den NH-Bereich des Peptids **54** im Vergleich zu Referenzpeptid **1** und liefert experimentelle Daten für die Beantwortung dieser Frage. Für Ersteres kann in Analogie zu **1** eine hohe Signaldispersion beobachtet werden, das Hot7-NH ist auf eine für dieses Proton typische Verschiebung von 9.91 ppm entschirmt (Tap8 besitzt kein amidisches Proton, siehe Molekülstruktur in Abbildung 3.90).^[44,342] Die Aminosäuren des hydrophoben Clusters werden kaum von der Änderung im *turn* beeinflusst. Dagegen erfährt das nicht-H-Brücken-gebundene Paar S5 und S10 eine Abschirmung (S10-NH) bzw. Entschirmung (S5-NH). T6-NH in *i*-Position hat in beiden Peptidepitopen **1** und **54** den gleichen Verschiebungswert, R9-NH in *i*+3-Position erfährt eine leichte Tieffeldverschiebung in **54**. Selbst in der *turn*-Region treten also kaum Veränderungen auf, da die globale Konformation vom hydrophoben Cluster stabilisiert wird und erhalten bleibt.

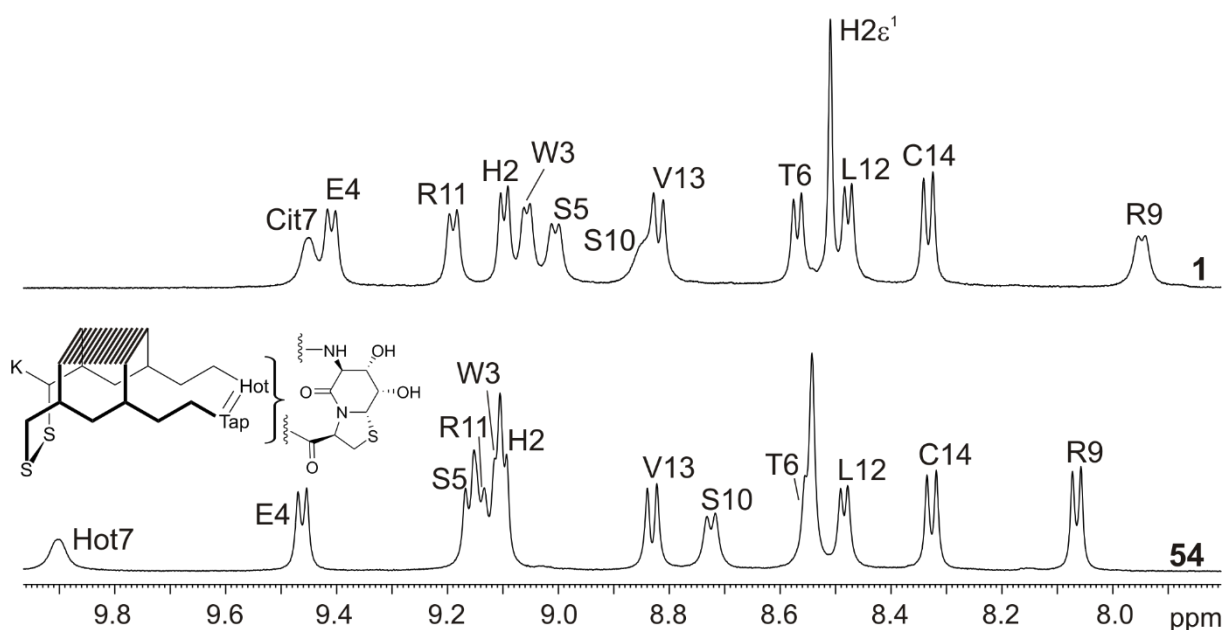


Abbildung 3.90. Amidische Bereiche der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D $_2$ O 9:1) der Peptidepitope **1** (Referenz) und **54** (Hot7=Tap8) im Vergleich.

Es finden sich Hinweise, dass das Hot=Tap-Epitop **54** global gesehen sogar noch eine etwas höhere Faltungspopulation aufweist: das Leu-H δ^h ist bis auf -0.30 ppm in das Hochfeld verschoben (im Vergleich zu -0.25 in **1**). Durch die β -turn-induzierenden Eigenschaften des Hot=Tap scheinen sich die β -sheet-Stränge im *hairpin* noch näher zu kommen, sodass auch das W3/L12-Kontaktpaar räumlich enger zusammenrückt. Insgesamt lassen die Daten darauf schließen, dass das bereits formstabile Referenzpeptid **1** durch den Einbau von Hot=Tap nur minimal zusätzlich stabilisiert wird. Eine additive Wirkung solcher zusätzlicher molekularer, konformationeller Stabilisatoren und Klammern (bspw. ein zweites Disulfid) könnten einen *hairpin* so rigidifizieren, dass ein 'Einfrieren' der dynamischen *hairpin*-Bewegung (ähnlich eines Akkordeons, vgl. Einleitung 1.2.1)^[59] möglich sein und diese experimentell greifbar machen könnte. An dieser Stelle konnte ein β -turn-Mimetikum als *hairpin*-Designelement erfolgreich mit dem hydrophoben Cluster kombiniert werden. Es steht dementsprechend für eine Kombination mit anderen (bereits beschriebenen) Modulen zur Verfügung.

3.16.4 Die Position 4 im hydrophoben Cluster - Ladungsmuster

Dass die Ladungsverteilung über das gesamte citrullinierte RA-Epitop eine wichtige Rolle spielt, wurde sowohl in verschiedenen Publikationen als auch in der vorliegenden Arbeit unter Beweis gestellt.^[282,285,286] In diesem Zusammenhang wurde unter den vereinheitlichten

Bedingungen der 15 Aminosäuren umfassenden Epitope weitere Derivate synthetisiert, die im Besonderen den hydrophoben Cluster betreffen. Das Glutamat in Position 4 hat eine klar definierte Ausrichtung und eine zentrale, stabilisierende Rolle zwischen Histidin und Arginin, mit dessen Guanidinium-Gruppe es eine potentielle Wasserstoffbrücke eingehen kann.^[272,282,289] Gleichzeitig trägt es mit seinem negativ geladenen Carboxylat zum Gesamtladungsmuster des *hairpins* bei. Um die Rolle des E4 für den hydrophoben Cluster und für die globale Sekundärstruktur im Detail zu untersuchen, wurde es einerseits gegen Glutamin ohne Ladung (Peptid **55**) und gegen Arginin mit einer positiven Ladung (Peptid **56**) ausgetauscht. In Abbildung 3.91 sind Piktogramme der Peptide zusammen mit den gemessenen, relativen Absorptionswerten in den ELISA-Tests einzusehen. Die ELISA-Ergebnisse stellen unter Beweis, dass Position 4, die sich nicht in direkter Hapten-Umgebung befindet, einen immensen Einfluss auf die Autoantikörperbindung hat, was bereits bei den Filaggrin-Foldon-Chimären (Kapitel 3.9) beobachtet wurde. Während ein Wechsel von Glutamat in **1** zu Glutamin in **55** zu einer Verringerung der Affinität von etwa einem Drittel führt, besitzt Epitop **56** mit einem Arginin in der gleichen Position nur 40% der ursprünglichen biologischen Aktivität.

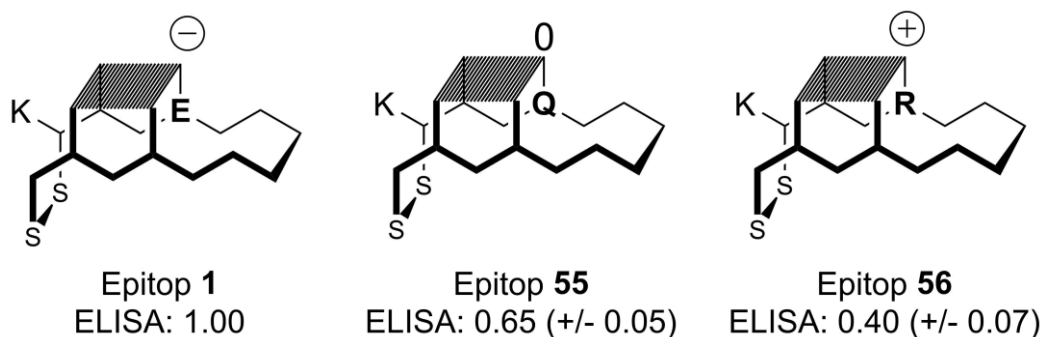


Abbildung 3.91. Piktogramme der Peptidepitope **1**, **55** und **56** mit der Sequenz $K^0C^1HWX^4STCitGRSTLVC^{14}$ (X: E, Q, R). Die gemessenen Absorptionen in ELISA-Tests sind untern dem jeweiligen Piktogramm relativ zu Referenzantigen **1** angegeben.

Die Auswertung der NMR-Spektren (Abbildung 3.92) soll klären, ob es sich um einen konformationellen Effekt handelt, oder ob die chemische Beschaffenheit der Seitenketten hier die entscheidende Rolle spielt. Die Gesamtdispersion im amidischen Bereich unterscheidet sich zwischen den Epitopen **1**, **55** und **56** kaum. Das amidische Proton der Aminosäure in Position 4 behält in allen Fällen die typische Tieffeldverschiebung auf etwa 9.40 ppm. Das direkt gegenüberliegende R11-NH zeigt eine leichte Abschirmung für **55** und **56**. Das Gleiche gilt für das H2-NH als auch für das H2- ϵ 1 der Imidazolseitenkette, während V13 keine bedeutende

Veränderung anzeigt. Der hydrophobe Cluster auf der Oberseite der β -*hairpin*-Ebene scheint also nur wenig durch die Änderung in Position 4 beeinträchtigt zu sein. In diesem Zusammenhang ist die Ausrichtung des Imidazols von H2 besonders interessant, da bekannt ist, dass es im Referenzpeptid zwischen der E4-Seitenkette auf dem gleichen β -Strang sowie V13 auf dem gegenüberliegenden β -Strang eingeklemmt ist.^[272,280,282] Dabei zeigt das H ϵ 1 in Richtung V13-H γ und das H δ 2 in Richtung E4-H β /H γ . Die relevanten Ausschnitte aus den NOESY-Spektren sind in Abbildung 3.93 für die Epitope **55** und **56** präsentiert. Sie bestätigen, dass der eben genannte Sachverhalt unabhängig von der Aminosäure in Position 4 gilt: Das H2-H ϵ 1 orientiert sich bevorzugt zum V13-H γ , während sich das H2- δ 2 in **55** zum Q4-H β^t /H γ und in **56** zum R4-H β /H γ ausrichtet. Diese Daten beweisen erneut, dass die lokale Konformation des hydrophoben Clusters durch eine Mutation in Position 4 keine grundlegende Veränderung erfährt.

Die Verschiebungen der Amidprotonen im *turn* (TCitGR, Abbildung 3.92) sind in allen Spezies nahezu identisch. Die Ausrichtung des Haptens Citrullin (immer entschirmt auf über 9.40 ppm) bleibt damit in allen Fällen ähnlich bis gleich. Ein Unterschied zwischen den Epitopen ergibt sich hier tatsächlich vor allem für die L12-H δ -Hochfeldverschiebung- und -Dispersion, die bei den Derivaten **55** mit Q4 und **56** mit R4 etwas geringer als bei **1** mit E4 ausfällt. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um einen indirekten, globalen Effekt, da die L12-Seitenkette in Relation zu X4 auf der anderen Seite des hydrophoben Clusters liegt. Durch leichte Störungen im hydrophoben Cluster kommen sich die β -sheet-Stränge nicht mehr so nahe, wie es in Referenzepitop **1** der Fall ist, sodass auch das Kontaktpaar W3/L12 einen größeren Seitenkettenabstand aufweist.

Die konformationelle Analyse weist dementsprechend darauf hin, dass die Abnahme der biologischen Aktivität bei den Peptidantigenen **55** (Q4) und **56** (R4) auf die chemische Funktionalität der Seitenketten zurückzuführen ist. Für keines der Derivate ergibt sich eine deutliche Änderung der räumlichen Struktur und der hydrophobe Cluster wird selbst durch gleich geladene Guanidiniumseitenketten (R4/R11), die sich abstoßen sollten, in seiner *hairpin*-stabilisierenden Funktion nicht beeinträchtigt. Die Wechselwirkung mit dem Antikörper wird aber offensichtlich durch ein Glutamin und besonders durch ein positiv geladenes Arginin geschwächt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Filaggrin-Foldon-Epitopchimären (Kapitel 3.9), bei denen die Mutation V4→E4 die Schwellenmutation für eine Wiederherstellung der biologischen Aktivität darstellt, scheint die negative Ladung in dieser Position vorteilhaft für eine hohe Antikörperaffinität zu sein.

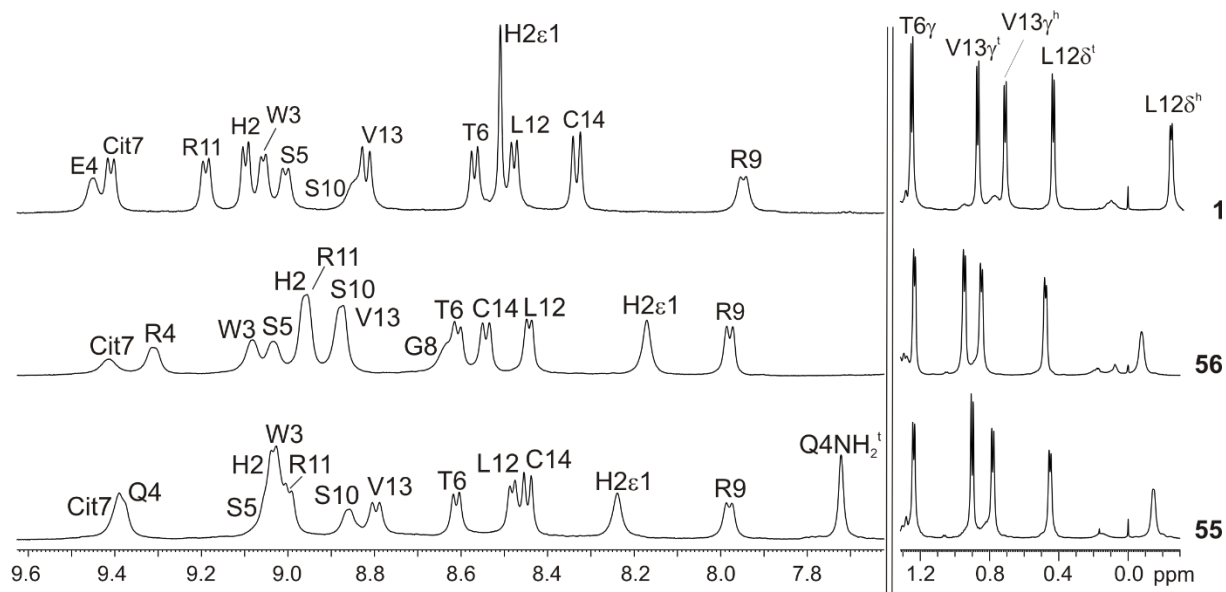


Abbildung 3.92. Amidische und L12-H δ -Bereiche der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D $_2\text{O}$ 9:1) der Peptidepitope **1** (Referenzantigen, E4), **55** (Q4) und **56** (R4).

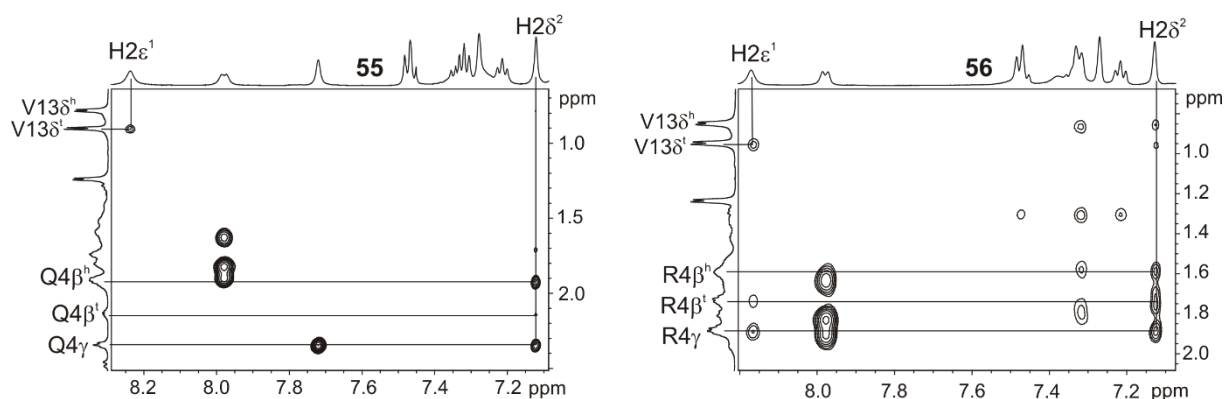


Abbildung 3.93. Ausschnitte aus den NOESY-Spektren (600 MHz, 280 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7.0)/D $_2\text{O}$ 9:1) der Peptidepitope **55** (Q4) und **56** (R4). Gezeigt sind die Kopplungsmuster der H2-Imidazol-Protonen $\epsilon 1$ und $\delta 2$ mit den Alkylprotonen der V13- und Q4-/R4-Seitenketten

3.17 Wann ist ein Peptid ein Epitop? Revisited

Einer der zentralen Leitfäden dieser Arbeit war die Frage, wie Chemiker zu einer zentralen immunologischen Herausforderung Antworten finden können: Was macht ein Peptid auf molekularer Ebene zu einem Epitop? Welche chemischen und konformationellen Eigenschaften führen zu einer Erkennung durch den Antikörper? Die rheumatoide Arthritis als

gut erforschte Autoimmunerkrankung stellte sich mit einer Vielzahl von Autoantikörperubtypen und zugehörigen citrullinierten Antigenen als gut geeignete Grundlage heraus. Im Folgenden werden die Antigeneigenschaften gegenüber dem meistverwendeten anti-CCP-, aber auch dem anti-Sa-Antikörper diskutiert und zusammengefasst. Eine fehlende Affinität gegenüber diesen Antikörpern schließt natürlich eine Erkennung anderer, bisher unbekannter Immunglobuline nicht aus, was im Besonderen den gewählten, komplementären Ansatz ausmacht.

Durch das gewählte Design, bei dem vor allem die Variation des konformationellen Raums der β -*hairpin*-Peptide angestrebt wurde, konnten atomaufgelöste Daten über den Einfluss der räumlichen Konformation auf die Paratop-Epitop-Wechselwirkungen gewonnen werden. Dieser Ansatz geht über bisherige, größtenteils eindimensionale Positionsmutation-Methodiken weit hinaus. Als wichtiges Strukturelement sind hier die D-Aminosäuren zu nennen, die zwar die Konformation des *backbones* und damit die Orientierung der zugehörigen Seitenketten verändern, die chemische Funktionalität aber unangetastet lassen. Ausgehend von all-L- β -*hairpin*-Referenzepitop **1** (K⁰C¹HWES⁵TCitGRS¹⁰RLVC¹⁴) wurden doppelte D-Mutationen in gegenüberliegenden Aminosäurepositionen auf dem antiparallelen β -*sheet* toleriert (Antigene **10** und **12** bis **17**) und erzeugen geknickte *hairpin*-Konformationen. Die ungewöhnlichen Strukturen von Epitop **10** (t6,r9) und **12** (s5,s10), deren D-Mutationen sich im *turn*-Bereich befinden, wurden vom konformationsselektiven anti-CCP-Antikörper nicht mehr erkannt, dafür aber vom eher sequenzselektiven anti-Sa-Immunglobulin. Die Orientierung des Haptens Citrullin als auch die Wechselwirkung mit der Fab-Bindungsstelle des jeweiligen Antikörpers konnten hier systematisch festgelegt und korreliert werden. Bei den Peptiden **13** und **15** bis **17**, die keine Vorzugskonformationen in wässriger Lösung anzeigten, stieg die Antikörperaffinität mit der Entfernung der Doppel-D-Mutation vom Hapten wieder an. Vom Design ungewöhnlicher Epitopstrukturen über deren detailgenaue Charakterisierung, hin zur Aufklärung des Antigen-Antikörper-Bindungsmodus konnten folglich essentielle Informationen für die Beantwortung der Titelfrage gewonnen werden.

Eine weitere Einschränkung der Epitopkonformation durch zusätzliche Disulfide führte für das all-L-Bidisulfid **19** (C1-C14, C5-C10) zu einer Verminderung der biologischen Aktivität um zwei Drittel bezogen auf den besten Binder **1**. Die Dynamik und damit eine etwaige Anpassbarkeit an die Bindungsstelle spielen für der Antigenität der Peptide also eine entscheidende Rolle. Die Kombination von D- und L-Disulfiden (Peptide **20** bis **22**) erwies in diesem Zusammenhang, dass ein zentrales D-Disulfid in den Positionen 5 und 10 [Epitope **21** (C1-C14,c5-c10) sowie **22** (c1-c14,c5-c10)] die Konformation so weit einschränkt und

verändert, dass eine Erkennung durch die verwendeten Paratope nicht mehr möglich ist. Es konnte kein Einfluss eines terminalen D-Disulfids in Epitop **20** (c1-c14,C5-C10) festgestellt werden, dessen gemessene Absorptionswerte sich nicht von denen von **19** (C1-C14,C5-C10) unterschieden.

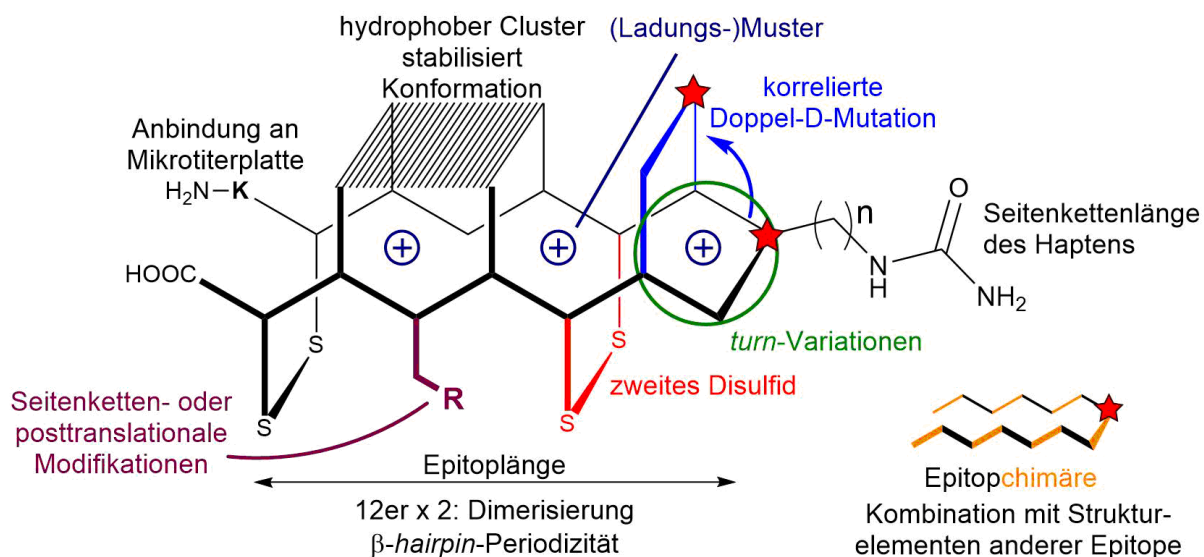


Abbildung 3.94. Schematische Zusammenfassung der eingesetzten molekularen Modifikationen (hier am Beispiel von RA-Antigenen), die zu einer atom aufgelösten Analytik der Peptidepitop-Eigenschaften führen. Jede einzelne Modifikation und auch jede Modulkombination ergibt wichtige Details darüber, was ein solches Peptidepitop überhaupt ausmacht und wann es durch einen Antikörper erkannt wird.

Welche Größe ein Epitop besitzen muss, um für eine ausreichende Variabilität in der chemischen Funktionalität über die gesamte Länge des β -hairpins zu sorgen, konnte mit den Derivaten **1** und **23** bis **27** gezeigt werden. 14 Aminosäuren (plus Lysin zur Anbindung an die ELISA-Platte, **1**) erwiesen sich als affinste Alternative, wobei auch 12er-Derivate mit einer geeigneten Citrullin-Umgebung sowohl in monomerer als auch in dimerer Form ähnlich aktiv waren (Epitop **23-Ahx-m** und **23d** mit T5,R8; **24m** und **24d** (S5,S8) zeigten keine Affinität). Ein auf zehn Aminosäuren verkürztes Derivat (**25**, hydrophober Cluster plus Cit-G im *turn*) ist dagegen inaktiv, genauso wie ein citrullinhaltiges Sequenzfragment.

Die Epitopchimären **37-41**, bei denen der Foldon-hairpin mit ebenfalls 14 Aminosäuren als Grundgerüst für eine Mutationsfolge Richtung Filaggrin ausgenutzt wurde, stellten unter Beweis, dass trotz geänderter chemischer Funktionalitäten, im Besonderen für die Stabilisierung der β -hairpin-Konformation, ein Epitop funktionell rekonstruiert werden kann. Nur die Kombination und eine fein abgestimmte Balance zwischen den Aminosäuren der

strukturegebenden (Foldon) und affinitätsbestimmenden (Filaggrin) Komponenten ermöglichte dies.

Ein weiterer, wichtiger Parameter stellt das Ladungsmuster des *hairpin*-Epitops dar, sowohl in lokaler als auch globaler Hinsicht. Das vollständig mit Arginin substituierte Peptid **7** (lokaler Einfluss auf das Hapten) sowie das vollständig citrullinierte Peptid **8** (globaler Einfluss der Ladungsverteilung), das also mehrere Citrulline in unterschiedlicher Umgebung präsentiert, wurden durch den anti-CCP-Antikörper nicht gebunden.

So wie die globale Konformation die Orientierung des Citrullins beeinflusst, sind konsequenterweise auch Mutationen direkt im Hapten-enthaltenden *turn* entscheidend. Dabei legt die Abfolge und Stereokonfiguration der Aminosäuren in *i+1*- sowie *i+2*-Position (Peptide **1** Cit-G, **44** cit-G, **45** G-Cit, **46** G-cit) sowohl den *turn*-Typ, also dessen geometrische Anordnung, als auch die Erkennung durch den Antikörper fest. Nur das Cit-G-Motiv wird mit hoher Affinität gebunden, alle anderen Derivate sind wenig bis gar nicht affin. Im Besonderen mit Citrullin in *i+2*-Position, ob nun L- oder D-konfiguriert, zeigt das Peptid keine Affinität gegenüber anti-CCP-Antikörpern. Die Aminosäure in *i-1*-Position hat nur einen geringen Einfluss auf die biologische Aktivität (Peptide **1** mit T6, **42** mit S6, **43** mit V6).

Nicht nur die Umgebung des Citrullins und des *turns*, sondern auch dessen Seitenkette selbst wurden untersucht. Die Variation der Seitenkettenlänge (Peptide **1** und **47** bis **49** mit unterschiedlicher Anzahl an Methylengruppen) ergab, dass die anti-CCP-Antikörper Citrullin selbst am besten erkennen, aber eine Kreuzreaktivität zu homocitrullinhaltigen Peptiden (**47**) besteht. Die kürzeren Derivate mit Alb (**48**) und Aub (**49**) wurden dagegen nicht mehr erkannt. β -Aminosäuren werden bezüglich ihrer biologischen Aktivität in nicht-Wasserstoffbrücken-Position toleriert und führen zum hochaktiven CCP-Epitop **50**. In Wasserstoffbrücken-Position (*i* und *i+3*, Peptid **51**) dagegen führen sie zum vollständigen Affinitätsverlust. Posttranslationale Modifikationen (Ribopyranosylierung der Serine in **52** und des Threonins in **53**) konnten mit geringen Affinitätseinbußen eingeführt werden.

Von der globalen räumlichen Struktur über die funktionelle Rekonstruktion, bis hin zu individuellen funktionellen Gruppen und sogar einzelnen Methylengruppen erbrachten die verschiedenen Designelemente molekulare Details für ein besseres Verständnis, welche Eigenschaften ein aktives oder eben inaktives Epitop in Bezug auf die RA-Antikörper (anti-CCP und anti-Sa) ausmachen (Abbildung 3.94). Diese systematische Vorgehensweise mit einer Vielzahl kombinierbarer β -*hairpin*-Designelemente steht beispielhaft für das Erforschen der Antigenität von Peptiden und sollte auf andere Systeme und Autoimmunerkrankungen übertragbar sein.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel der Autoimmunerkrankung rheumatoide Arthritis (RA) gezeigt, wie relevante Peptidepitope und deren Konformation systematisch geplant, synthetisiert, charakterisiert und für eine immundiagnostische Anwendung ausgewählt werden können. Dabei wurden Antworten auf die Fragen gegeben, welche (im besonderen konformationelle) Details ein Peptid überhaupt zu einem Epitop machen.

Das Design der Peptide wurde am Sekundärstrukturmotiv des β -*hairpins* ausgerichtet, wobei nur solche Moleküle in Frage kamen, die eine Vorzugskonformation in wässriger Lösung ausbildeten. Neben der Tatsache, dass dies eine detaillierte (NMR-)Analytik überhaupt erst erlaubt, bringt es den Vorteil mit sich, dass indirekte konformationelle Prozesse eine weniger wichtige Rolle bei der molekularen Erkennung spielen. Dadurch wird der Bindungsmodus in Richtung Schlüssel-Schloss-Prinzip (*key-and-lock*) dirigiert, was eine tatsächliche Konformations-Aktivitäts-Beziehung möglich macht, besonders im Gegensatz zum *conformational selection*- oder *induced fit*-Prozess eines *random coil*-Peptids (vgl. Kapitel 3.15, Abbildung 3.80). Die eingesetzten *hairpin*-Designelemente, um den konformationellen Raum der Epitope festzulegen und zu variieren, umfassten:

- den hydrophoben Cluster (CHWE...RLVC) als maßgeblich stabilisierendes Modul. Dabei konnten nahezu alle Seitenkettenrotamere bestimmt werden. Die konformationellen Eigenschaften des zentralen Tryptophans, die stark von den umgebenden Aminosäuren abhängig sind, wurden im Detail untersucht.
- D-Aminosäuren direkt gegenüberliegend auf dem *hairpin* in Wasserstoffbrücken- und nicht-Wasserstoffbrückenpositionen. Sie wurden insbesondere im *turn*-Bereich toleriert und führten zum systematischen Abknicken des *backbones*. In einem Doppel-D-Scan wurden alle Positionen des *hairpins* mutiert.
- zwei Disulfidbrücken, kombiniert in unterschiedlichen Stereokonfigurationen (L/D), zeigten auf Grundlage ihrer Vorzugskonformationen hoch regioselektive oxidative Faltungsprozessen. Intermediär auftretende Monodisulfide konnten isoliert und mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert werden (für Spezies mit terminalen D-Thiolen konnte so bestimmt werden, dass das zentrale Disulfid, unabhängig von dessen Konfiguration, zuerst gebildet wird).
- Deletionen von Aminosäurepaaren und daraus resultierende Dimerisierungen. $4n+2$ Aminosäuren (in diesem Fall 10 und 14) führten zu stabilen *hairpin*-Monomeren. $4n$

Aminosäuren (hier 12) führten, je nach Sequenz, zu Monomeren und Dimeren, wobei die regioselektive Luftoxidation von 12er-Tetrathiolsequenzen (jede dritte Aminosäure ist ein Cystein!) ohne den Einsatz von orthogonalen Cystein-Schutzgruppen immer 24er-Tetradisulfid-Dimer hervorbrachten. Diese Dimere stellen strukturell antiparallele Scharniere (engl. *hinge*) dar, deren Öffnungswinkel mittels Ionenmobilitätsspektrometrie untersucht wurde.

- Epitopchimären, bestehend aus Filaggrin als biologisch aktivem und dem Foldon-*hairpin* als strukturgebendem Part. Es wurde durch eine sukzessive, rational geplante Mutationsfolge eine Sequenz gefunden, die unter Ausbildung einer Vorzugskonformation antikörperaffin war (funktionelle Rekonstruktion).
- *turn*-Variationen, wobei unterschiedliche Konfigurations-Kombinationen in *i+1*- und *i+2*-Position (Cit-G, cit-G, G-Cit, G-cit), die Umgebung des Haptens Citrullin (TCitG, SCitG, VCitG) sowie ein *turn*-Mimetikum (Hot=Tap) untersucht wurden.
- Citrullin-Homologe (Alb, Aub, Hci).
- β -Aminosäuren, ebenfalls direkt gegenüberliegend in H-Brücken- und nicht-H-Brücken-Position, wobei jeweils hochpopulierte *hairpins* erhalten wurden.
- sowie Ladungsmuster-Variationen. Synthetisiert wurden eine all-Arginin- und eine all-Citrullin-Spezies, die beide *hairpins* ausbilden, aber biologisch inaktiv sind. Außerdem wurde E4 mit einer negativen Ladung unter physiologischen Bedingungen durch ein positiv geladenes Arginin sowie ein ungeladenes Glutamin ausgetauscht.

Sie lieferten ein Arsenal an breit anwendbaren synthetischen Modulen, deren Einbau und Kombination ungewöhnliche *hairpin*-Konformationen hervorbrachte.

Die Charakterisierung der räumlichen Struktur und Dynamik der Peptidspezies wurde mittels NMR-Spektroskopie detailliert durchgeführt. Dabei wurden 3J -Kopplungskonstanten, NOE-Kontakte, Temperaturgradienten (im Besonderen der Amidprotonen) und Seitenkettenrotamere (χ -Winkel) für eine möglichst exakte geometrische Parametrisierung der Peptidkonformationen bestimmt. Globale Strukturinformationen über die Beschaffenheit und Einflüsse der eingesetzten *hairpin*-Designelemente konnten mit einem Satz an ungewöhnlichen, kohärent vergleichbaren CD-Spektren erhalten werden. Die Massenspektrometrie diente dabei nicht nur zur Prüfung der Identität der Biomoleküle, sondern auch zur Messung ihrer Ionenmobilität (IMS) und der daraus abgeleiteten Stoßquerschnitte.

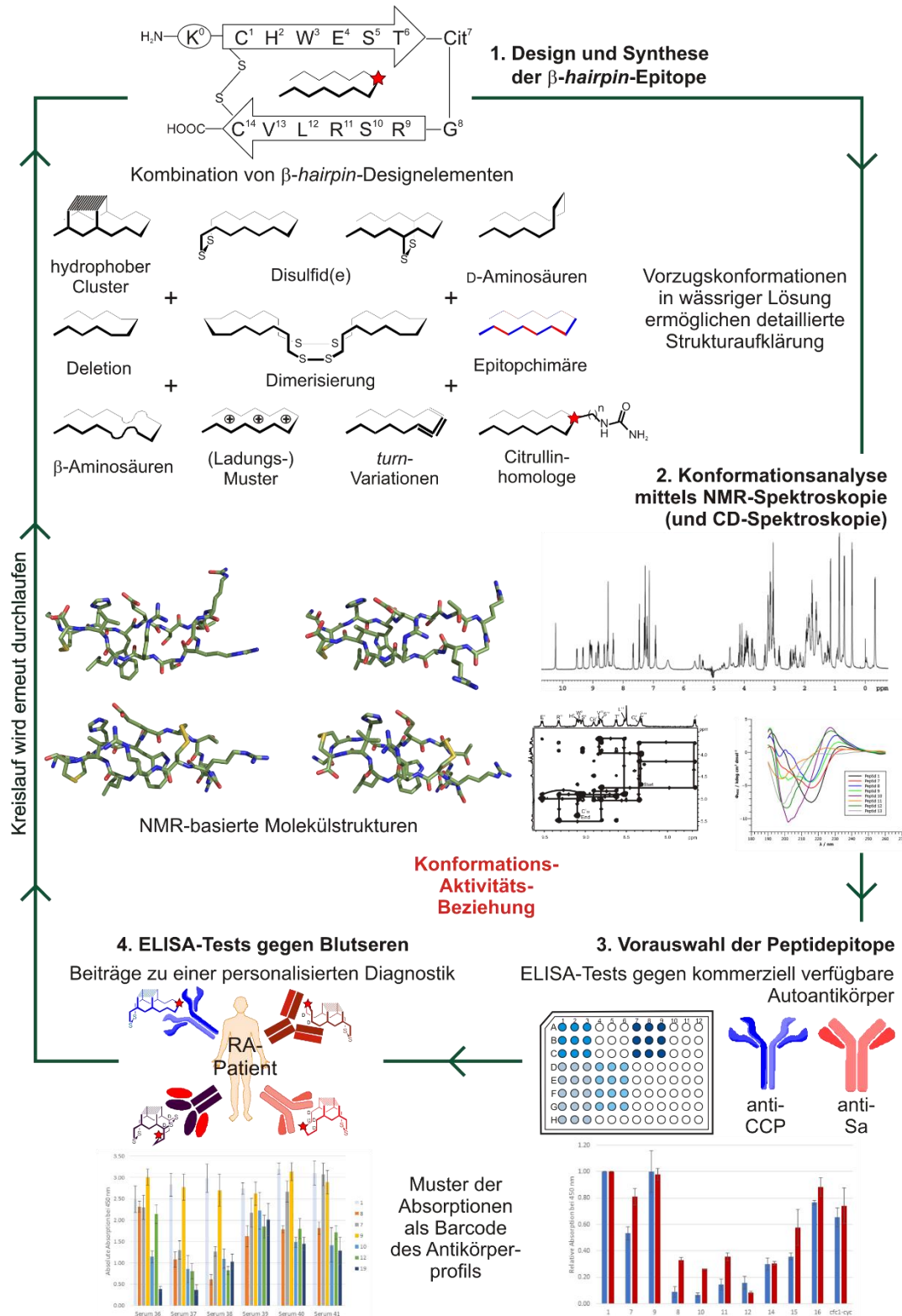


Abbildung 4.1. In der vorliegenden Arbeit wurden formstabile β -hairpin-Peptidepitope geplant und synthetisiert, deren Konformation mittels NMR-Spektroskopie detailliert analysiert, eine Vorauswahl der Epitope auf Grundlage von ELISA-Tests gegen kommerziell verfügbare RA-Autoantikörper getroffen, um abschließend in personalisierten Tests gegen Blutseren verwendet zu werden. Die gewonnenen Daten über die Konformations-Aktivitäts-Beziehung fließen in die Gestaltung von neuen Peptidantigenen ein und der genannte Kreislauf wird erneut durchlaufen.

Die konformationellen Parameter der Antigene wurden anschließend in ELISA-Tests mit der biologischen Aktivität gegenüber RA-Autoantikörpern korreliert. Dafür konnte eine Optimierung der Assays durch Vereinheitlichung der Peptidlänge auf 15 Aminosäuren mit N-terminalem Lysin als am Besten geeigneter Linker zur Mikrotiterplatten-Oberfläche erreicht werden. Die synthetisierten Peptidepitope wurden dabei einer Vorauswahl unterzogen, indem sie zunächst gegen kommerziell erhältliche RA-Autoantikörper (anti-CCP und anti-Sa) getestet wurden. Interessant waren dabei vor allem diejenigen Spezies, die gegenüber dem in der Diagnostik am häufigsten verwendeten anti-CCP-Antikörper gerade nicht oder wenig affin sind oder die beiden verwendeten Paratope anhand der gemessenen Absorptionen unterscheiden können.

Durch den Einbau von gegenüberliegenden D-Aminosäurepaaren auf dem antiparallelen *β -sheet* war die Unterscheidung der anti-CCP- und anti-Sa-Antikörper möglich. Die Doppel-D-Varianten erkannten nur das eher sequenzselektive anti-Sa-Paratop, während der eher konformationsselektive anti-CCP-Antikörper nicht gebunden wurde. Gleichzeitig konnten also auch Informationen über die Konformation-Aktivitätsbeziehung erhalten werden.

In der Folge wurden zueinander komplementäre Peptide (in Bezug sowohl auf ihre Konformation als auch auf ihre biologische Aktivität) in einem Set zusammengefasst, welches in ELISA-Tests gegenüber Blutseren von CCP-positiven und CCP-negativen Patienten eingesetzt wurde. Mit dieser Zusammenstellung von Epitopen konnte ein Muster an gemessenen Absorptionen, ähnlich einem Barcode, für jedes Blutserum erhalten werden. Auf diese Weise konnten sowohl durch die detektierte Kombination von relativen Signalintensitäten innerhalb eines einzelnen Barcodes als auch im direkten Vergleich aller Barcodes untereinander bisher unerkannte und überlappende Profile identifizieren kann. Dieser erste Beitrag zu einer individualisierten Diagnostik ergänzt aktuelle Testsysteme, bei der nur einzelne RA-Autoantikörper und maximal noch deren Titer nachgewiesen werden.

Das ungewöhnliche Strukturmotiv der Tetradisulfid-Dimere wurde als Dimerisierungsdomäne erstmals sowohl in ein Enzym (Limonen-Epoxid-Hydrolase, ~19 kDa) sowie einen Antikörper (~150 kDa) mittels rekombinanter Methoden eingebaut. Dafür wurde Citrullin gegen Arginin ausgetauscht, was die außerordentlich hohe Dimerisierungstendenz nicht beeinflusste. Im Immunglobulin ersetzte das antiparallele *hinge*-Peptid die eigentlich parallele *hinge*-Region. Die biologischen Aktivitäten der Proteine wurden dabei nicht beeinträchtigt. So konnte mit einer ursprünglich für die RA-Diagnostik optimierten Sequenz eine neue, kodierbare Peptiddomäne für den Einsatz in der Proteinchemie entwickelt werden.

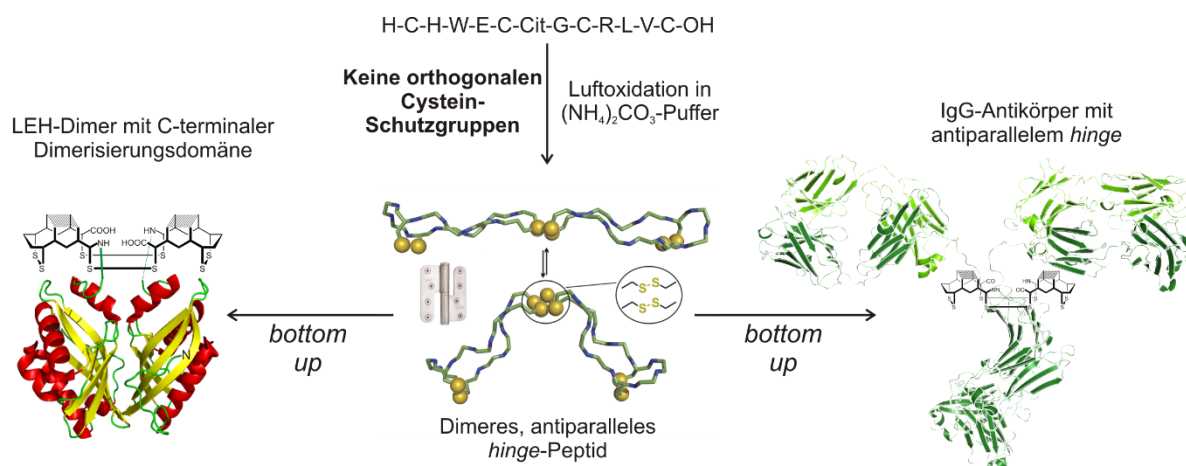


Abbildung 4.2. Regioselektive Oxidation der Thiol-reichen 12er-Sequenz führten zu disulfidreichen Epitopdimeren mit *hinge*-Charakter (Scharnier-Charakter). In einem anschließenden *bottom up*-Ansatz wurde diese verlässliche Dimerisierungsdomäne rekombinant in ein Enzym (Limonen-Epoxid-Hydrolase, ~19 kDa) und einen IgG-Antikörper (~150 kDa) eingebracht und somit völlig neue Proteinstrukturen erhalten.

4.1 Conclusion

Utilising the autoimmune disease rheumatoid arthritis as role model, it could be shown how relevant peptide epitopes and their conformations are systematically designed, characterised and chosen for immunodiagnostic applications. Thereby, answers to the question, what actually makes a peptide an epitope, could be found.

The design was guided by β -hairpins as secondary structure motif. Only molecules with a preferred conformation in aqueous solution were chosen for further experiments, which allows detailed (NMR) analytics in the first place. As a consequence, indirect conformational processes play a minor role during the molecular recognition process and therefore the binding mode is simplified to a key and lock like process. The latter allows for an actual conformation-activity-relationship study, especially in contrast to the conformational selection or induced fit processes of random coil peptides. The β -hairpin design elements, that were employed to determine and vary the conformational space of our epitopes, encompassed

- the hydrophobic cluster (CHWE...RLVC) as main stabilising module. Almost all sidechain rotamers could be determined. The conformational properties of the central tryptophan, which are strongly dependent on the surrounding amino acids, have been investigated in detail.

- D-amino acids directly opposing each other on the hairpin in hydrogen-bonded and non-hydrogen-bonded positions. They were mostly tolerated in the turn region and led to systematic kinks of the backbone. A complete double-D scanning for all *hairpin* positions was undertaken, too.
- two disulfide bridges, which were combined in different configurations (L/D), showed a highly regioselective oxidative folding process based on their preferred conformations. Intermediate mono-disulfides could be isolated and characterised via NMR spectroscopy and mass spectrometry (thus, it could be determined that species with terminal D-thiols had their central disulfide closed first, independent of the latter's stereoconfiguration).
- deletion of amino acid pairs and resulting dimerisation. $4n+2$ amino acids (in this case 10 or 14) led to stable hairpin monomers. $4n$ amino acids (12) led to monomers or dimers, depending on their sequence. 12mer tetra-thiol sequences (every third amino acid constitutes cysteine!) always generate 24mer tetra-disulfide dimers upon air oxidation without the need for orthogonal cysteine protecting groups. In regard to their molecular structure, these dimers are antiparallel hinges whose opening angle has been accessed by ion mobility spectrometry.
- epitope chimeras, assembled from filaggrin as biologically active part and the foldon hairpin as conformationally relevant part. By application of rationally designed mutation steps, a sequence with both biological activity and a preferred conformation could be obtained (functional reconstruction).
- turn variations. Different configurations in $i+1$ and $i+2$ position (Cit-G, cit-G, G-Cit, G-cit), the direct surroundings of the hapten citrulline (TCitG, SCitG, VCitG) and a turn mimic (Hot=Tap) were investigated.
- citrulline homologues (Alb, Aub, Hci).
- β -amino acids, also directly opposing each other on the hairpin in hydrogen-bonded and non-hydrogen-bonded positions. Highly populated hairpin folds were maintained.
- charge pattern variations. All-arginine and all-citrulline derivatives were synthesised, which exhibit hairpin conformations, but do not recognise anti-CCP-antibodies. Moreover, E4 with a negative charge under physiological conditions was exchanged for a positively charged arginine and a neutral glutamine.

They delivered an arsenal of broadly applicable, synthetic modules, whose implementation and combination established unusual hairpin conformations.

The characterisation of three-dimensional peptide structures and dynamics was primarily undertaken by NMR spectroscopy. Thereby, 3J coupling constants, NOE contacts, (amide) temperature gradients and sidechain rotamers (χ angles) were determined for an exact parametrisation of the peptide conformations. Global structural information about the nature and influences of the utilised hairpin design elements could be obtained with a set of unusual, coherently comparable CD spectra. Mass spectrometry did not only confirm the identity of all biomolecules, but was also employed for measuring their ion mobility (IMS) and the deduced collisional cross sections.

The antigen conformation was correlated with their biological activity against RA autoantibodies via ELISA. Therefore, the tests were optimised by standardisation of the peptide lengths to 15 amino acids with a N-terminal Lysin residue for optimal plate binding. The synthesised peptide epitopes were preselected by testing them against commercially available RA autoantibodies (anti-CCP and anti-Sa). Those species, which showed low to no affinity against the most utilised anti-CCP antibody or which were able to distinguish between the two employed paratopes by means of measured absorption values, were of special interest. The installation of opposing D-amino acid pairs on the antiparallel β -strands for example, made such a distinction possible. The double-D variants bound to the rather sequence selective anti-Sa paratope, while the rather conformation selective anti-CCP antibody was not recognised. At the same time, information about the conformation-activity-relationship could also be obtained.

Based on that knowledge, mutually complementary peptides (in regard to their conformation as well as their biological activity) could be pooled into a set, which was then tested against CCP positive and CCP negative RA patients' blood sera. With this compilation, a pattern of measured absorptions, similar to a barcode, could be obtained for every serum. Thus, unique combinations of relative signal intensities within a single barcode as well as the comparison of all barcodes among each other allowed the identification of so far unknown or overlapping profiles. This contribution towards an individual RA diagnosis supplements current test system, which only detect single RA autoantibodies and their titres, at most.

The unusual structural motif of the tetra-disulfide dimers was utilised as reliable dimerisation domain in an enzyme (limonene epoxide hydrolase, ~19 kDa) as well as an antibody (~150 kDa), introduced via recombinant methods. Therefore, citrulline was exchanged for arginine, which did not alter the exquisitely high dimerisation tendency. In the immunoglobuline, it replaced the originally parallel hinge as antiparallel hinge. A codable peptide sequence, that was originally optimised for the diagnosis of RA, could thus be developed for protein chemistry needs.

5. Ausblick

Die bisher gewählten β -*hairpin*-Designelemente konnten erfolgreich auf *hairpin*-Peptide angewendet werden, um ungewöhnliche konformationelle Räume zu erschließen. Besonders bewährt hat sich das Anwenden dieser synthetischen Module auf Aminosäurepaare in direkt gegenüberliegenden Positionen (H-Brücken-gebunden und nicht H-Brücken-gebunden) auf dem antiparallelen β -*sheet*. Diese synthetischen Module können auf ihre Anwendbarkeit in bisher wenig verwendeten Positionen, auch innerhalb des hydrophoben Clusters, und in unterschiedlichsten Kombinationen untersucht werden. In diesem Zusammenhang bleibt die Frage zu klären, ob die beiden gemeinsam verwendeten Disulfide in den Positionen 1-14 und 5-10 eine korrelierte Mutation (z. B. D-Aminosäuren) im hydrophoben Cluster, die beim bisher verwendeten terminalen Monodisulfid (c1-c14, S5/S10) zu einem Zusammenbruch der Konformation führen, überkompensieren und die Struktur stabilisieren können. So werden auch Daten über das Zusammenspiel der beiden Struktur motive, also hydrophober Cluster und Disulfide, erhalten. Das Repertoire aller anwendbaren chemischen Methoden lässt sich beliebig erweitern, bspw. durch den Einsatz von ω -Aminosäuren, *turn*-Mimetika, dynamisch-kovalenter Chemie (z. B. Boronsäureester, Imine), Aminobenzoesäuren oder Thioamide. Dementsprechend steht ein breites Arsenal zur Modifikation der konformationellen Eigenschaften von Epitopen für diagnostische Zwecke zur Verfügung.

Die ersten ELISA-Tests von sowohl CCP-positiven als auch CCP-negativen Patientenseren lieferten vielversprechende Ansätze für das Erstellen von Antikörperprofilen und der Unterscheidung von Subtypen mittels eines ausgewählten Satzes von Peptidkonformationen. Diese Tests sollten auf eine breitere Basis mit einer statistisch relevanten Anzahl an RA-Patienten gestellt werden. So können unter den CCP-positiven Patienten weitere Profile und damit RA-assoziierte Autoantikörper entdeckt werden. Bei den CCP-negativen RA-Erkrankten wiederum besteht die Möglichkeit, einen diagnostischen Marker jenseits der anti-CCP-Antikörper zu identifizieren. Dies würde letztlich dem Ziel der Verbesserung der diagnostischen Sensitivität kommerzieller Tests dienen, und zwar in komplementärer Weise. Alle Erkenntnisse, die in Bezug auf sich ergänzende Antikörper-Affinitäten gewonnen werden, fließen in die Planung sowie Synthese neuer Epitope ein und sollten auch auf andere Autoimmunerkrankungen und deren Antigene anwendbar sein. Eine darüberhinausgehende technische Anwendung der Epitope findet sich in der Affinitätschromatographie bzw. in der sogenannten Immunadsorption,^[360] bei der gezielt IgG-Antikörper (im Speziellen diejenigen, die die Autoimmunerkrankung vermitteln) aus dem Blut von Patienten adsorbiert werden.

Die molekulare Beweglichkeit und Dimerisierungstendenz der disulfidreichen *hinge*-Peptide kann mit einer Vielzahl an Modifikationen eingehend untersucht werden. Dafür können die *turn*-Sequenz oder die terminalen Aminosäuren variiert und unter deren Kombination neue Heterodimere erhalten werden. Neben der Darstellung neuer, dimerer Epitope wäre somit der globale Einfluss des *turns* bzw. der Termini auf die jeweiligen Monomeruntereinheiten als auch auf die Dimerisierungspositionen erforschbar. Letztere, die die zwei antiparallelen, intermolekularen Disulfide enthält, könnte mit Thiiothreonin (Tht) oder Penicillamin (Pen) substituiert werden, da diese Aminosäuren unterschiedliche Cys/Tht/Pen-Disulfidpaare unter Ausnutzung der jeweiligen Redoxpotentiale ausbilden. Damit lassen sich Monomerisierungen, die für die Tetrathiolvorläufer bisher nicht reproduzierbar erreicht wurden, forcieren oder aber auch unsymmetrische intermolekulare Disulfidpaare erhalten. Die Konsequenz sollten entscheidende Unterschiede auch in NMR-Spektren sein, die Aufschluss über die Triebkraft der Dimerisierung geben. Letztlich bleibt in diesem Zusammenhang die Frage zu klären, ob die Scharnierbewegung der Peptide tatsächlich kontinuierlich stattfindet, also ob die erhaltenen analytischen Daten zeitlich gemittelt sind, oder ob es sich um eine fixierte Konformation mit festgelegtem Öffnungswinkel handelt.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten des dimeren Tetradisulfids finden sich in der Metall- oder Eisen-Schwefel-Cluster-Bindung (in diesem Fall muss die Sequenz teilweise oder vollständig reduziert vorliegen). Disulfidreiche Peptide werden außerdem als Wirkstofftemplate verwendet. Solche, die in der Natur vorkommen (Defensine, Cyclotide, Tachyplesine, Protegrine etc.), zeigen eine vielversprechende antibiotische Wirkung. Die *hinge*-Peptide könnten also als synthetische Vorläufer für derartige Anwendungen dienen.

Als verlässliche Dimerisierungsdomäne mit antiparalleler Verknüpfung wurde die 12er-Sequenz CHWECRGCRLVC auch in Enzyme und in Antikörper eingebracht. Dabei stellt sich weiterhin die Frage nach dem Einfluss einer solchen synthetischen, unnatürlichen Domäne auf die Proteinstruktur und -funktion. Weitere Ziele sind solche Proteine, die bisher in monomerer Form vorliegen und durch Einbau der genannten Sequenz zielgerichtet dimerisiert werden. Biomoleküle, die die disulfidreiche Domäne enthalten, könnten durch selektive Reduktion eines der Disulfide und anschließende Konjugation mit gewünschten Molekülen (z. B. Wirkstoffe oder Fluoreszenzmarker) regioselektiv gelabelt werden. Erste Fluoreszenz-Messungen haben unterdessen ergeben, dass hier synthetisierte β -*hairpins* mit dem zentralen Tryptophan selbst als Marker dienen können. In Proteinen wären sie dann ähnlich einem *green fluorescent protein* einsetzbar. Das Tetradisulfid-Dimer zeigt dabei bisher keine Fluoreszenz, sodass noch geeignete Modifikationen gefunden werden müssen.

6. Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Anmerkungen

Lösungsmittel und Reagenzien

Die verwendeten Lösungsmittel wurden destillativ aufgereinigt. DMF für die Peptidsynthese wurde in der Reinheit *peptide grade* von der Firma *Iris Biotech* (Marktredwitz) erworben. Alle kommerziell erhältlichen Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Aluminium-DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzauslöschung mit einer UV-Lampe ($\lambda = 254$ nm) oder durch die Verwendung der unten aufgeführten Färbereagenzien. Dazu wurde das entwickelte Chromatogramm in die jeweilige Lösung eingetaucht und die Farbreaktion durch anschließendes Erwärmen mit einem Heißluftfön herbeigeführt.

- Ninhydrin-Lösung: 1.4 g Ninhydrin, 16 mL Eisessig, 400 mL n-Butanol
- Kaliumpermanganat-Lösung: 2.5 g KMnO₄, 12.5 g Na₂CO₃, 250 mL H₂O

Flash-Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Pressluft-Überdrucks.

Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an den folgenden Geräten aufgenommen:

- *Bruker AV 300* (300 MHz) für ¹H-Routinemessungen
- *Bruker AV 600* für ¹H- (600 MHz) und 2D-Spektren der Peptide

Messungen am *Bruker AV 300* erfolgten mittels eines automatischen Probenwechslers (*BACS-60*). Die Messungen am *Bruker AV 600* wurden von Ronald Wagner, einem Mitarbeiter der NMR-Abteilung, oder in Selbstmessung durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in *parts per million* (ppm) angegeben und wurden aus der Mitte der Kopplungsmuster abgelesen. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben. Als interner Standard

diente das Resonanzsignal des verwendeten Lösungsmittels (DMSO_{d6} : ^1H : $\delta = 2.50$ ppm, ^{13}C : $\delta = 39.52$ ppm; CDCl_3 : ^1H : $\delta = 7.26$ ppm, ^{13}C : $\delta = 77.16$ ppm, D_2O : ^1H : $\delta = 4.79$ ppm). Bei Messungen in Phosphat-puffer/ D_2O (9:1) wurde als Standard TSP_{d4} (Natriumtrimethylsilylpropionat) zugegeben (Resonanzsignal ^1H : $\delta = 0.00$ ppm). Die eingestellten pH-Werte sind bei der jeweiligen Auswertung der analytischen Daten der Peptide (Kapitel 5.4) angegeben.

Die angegebenen Daten sind phänomenologisch, d.h. sie entsprechen der Erscheinung des Signals und nicht der theoretisch zu erwartenden Multiplizität. Des Weiteren bedeutet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qi = Quintett, m = Multiplett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Duplett eines Doppeldupletts. Diastereotope Protonenpaare, deren stereochemische Zuordnung nicht möglich war, wurden mit den Indices t für das tieffeldige und h für das hochfeldige Proton bezeichnet. Die Lösungsmittelsignale sowie die Resonanzsignale von im Lösungsmittel enthaltenem Wasser wurden in den abgebildeten Spektren nicht beschriftet ($\delta = 3.33$ ppm für DMSO_{d6} und $\delta = 1.56$ ppm für CDCl_3). Die Zuordnung der Protonenverschiebungen erfolgte mit der Hilfe von 2D-Experimenten (COSY, TOCSY, NOESY/ROESY, HSQC).

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden durch Mitarbeiter der Massenspektrometrischen Abteilung an einem *Finnigan LTQ-FT* Massenspektrometer der Firma *Thermo Fischer Scientific* aufgenommen. Alle gemessenen Spektren wurden mit der Elektrospray-Ionisations-Methode (ESI) aufgenommen. Die angegebenen Werte sind Masse-zu-Ladung-Verhältnisse und entsprechen jeweils den Massen der Isotope mit der größten natürlichen Häufigkeit. Für LC-MS-Messungen der Peptide wurde das oben genannte Gerät mit einer HPLC-Anlage (*Agilent 1100 MSD*) gekoppelt.

Trypsin-Abbau

Wenige Mikrogramm der Peptiddimere wurden in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer (50 mM, pH = 8.0) gelöst und ein Überschuss an Trypsin zugegeben. Nach 5 min bei 37 °C wurde der Verdau durch Addition von 2 μL Ameisensäure gestoppt. Die Lösung wurde direkt anschließend einer LC-MS-Messung unterzogen.

Ionenmobilitätsspektrometrie

Ionenmobilitätsmessungen wurden an einem *Synapt G2-Si* (Waters) von Uwe Linne durchgeführt. Die experimentellen Parameter wurden von literaturbekannten Methoden übernommen. Das Spektrometer wurde auf der Basis einer Prozedur von BUSH *et al.* kalibriert, wobei zweifach und dreifach geladene Polyalanin-Spezies als Referenz verwendet werden.^[320] Auf diese Weise können Kollisions-Querschnitte (*collisional cross sections*, CCS) über die gemessene TWIM-Driftzeit (*travelling wave ion mobility*) berechnet werden.

<i>ESI + V Resolution mode</i>		<i>DC potentials (V)</i>		<i>Traveling wave parameters</i>	
<i>m/z range</i>	50 -2000	<i>Trap Collision Energy</i>	5	<i>Source Wave Velocity (m/s)</i>	300
<i>Capillary (kV)</i>	2.7	<i>Transfer Collision Energy</i>	0	<i>Source Wave Height (V)</i>	0.2
<i>Source Temperature (°C)</i>	70	<i>Trap DC Entrance</i>	3	<i>Trap Wave Velocity (m/s)</i>	300
<i>Sampling Cone (V)</i>	20	<i>Trap DC Bias</i>	40	<i>Trap Wave Height (V)</i>	5
<i>Extraction Cone (V)</i>	5	<i>Trap DC</i>	-1	<i>IMS Wave Velocity (m/s)</i>	350
<i>Source Gas Flow (mL/min)</i>	20	<i>Trap DC Exit</i>	0	<i>IMS Wave Height (V)</i>	20
<i>Desolvation Temperature (°C)</i>	250	<i>IMS DC Entrance</i>	25	<i>Transfer Wave Velocity (m/s)</i>	350
<i>Cone Gas Flow (L/hr)</i>	0	<i>Helium Cell DC</i>	35	<i>Transfer Wave Height (V)</i>	5
<i>Desolvation Gas Flow (L/hr)</i>	500	<i>Helium Exit</i>	-5		
<i>Trap Gas Flow (mL/min)</i>	0.4	<i>IMS Bias</i>	0		
<i>Helium Cell Gas Flow (mL/min)</i>	180	<i>IMS DC Exit</i>	0		
<i>IMS Gas Flow (mL/min)</i>	70	<i>Transfer DC Entrance</i>	4		
<i>Sample Infusion Flow Rate (μL/hr)</i>	300	<i>Transfer DC Exit</i>	15		

UV/Vis-Spektroskopie

Absorptionsmessungen wurden an einem *Thermo Fisher Multiskan GO* in PE-Einmalküvetten für die Harzbeladungsbestimmung ($d = 1$ cm) oder in Mikrotiterplatten der Firma *Corning* für ELISA-Tests durchgeführt.

CD-Spektroskopie

CD-Spektren wurden eigenständig an einem *Jasco J-810-150S* Spektropolarimeter aufgenommen. Folgende Parameter wurden dabei gewählt:

- Peptidkonzentration: 200 μM in wässriger Lösung
- Optische Weglänge: 0.1 cm
- Wellenlängenbereich: 260 nm - 190 nm
- Bandweite: 0.5 nm
- Scan-Geschwindigkeit: 10 nm/min
- Temperatur: 300 K

Messdaten von drei aufeinanderfolgenden Experimenten wurden gemittelt und verarbeitet, um das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu verbessern. Die *mean residue ellipticity* (mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest des gemessenen Peptids; MRE in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) wurde über die Gleichung

$$\theta_{\text{MRE}} = \frac{\theta \cdot M_r}{c \cdot l \cdot n}$$

bestimmt, wobei θ die gemessene Elliptizität, M_r das Molekulargewicht des Peptids, c die Konzentration, l die optische Weglänge der Küvette und n die Anzahl der Peptidbindungen darstellt.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden auf einem *Jasco FP-6500* Spektrofluorometer aufgenommen. Folgende Parameter wurden dabei gewählt:

- Peptidkonzentration: 5 μM in wässriger Lösung
- Bandweite (Anregung): 5 nm;
Bandweite (Emission): 10 nm
- eingestrahlte Wellenlänge (Anregung): 348 nm;
eingestrahlte Wellenlänge (Emission): 280 nm
- gemessener Wellenlängenbereich (Anregung): 220 nm – 330 nm;
gemessener Wellenlängenbereich (Emission): 300 nm – 500 nm
- Sensitivität: Medium
- Scan-Geschwindigkeit: 200 nm/min
- Temperatur: 300 K

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Analytische HPLC-Chromatogramme wurden an einem *Thermo Fisher Ultimate 3000 LC* System mit den folgenden Parametern gemessen (sofern nicht anders angegeben):

- Säule: ACE 2.5 SuperC18, 150 x 2.1 mm
- Gradient: 10-40% B in 10 min (A: Wasser + 0.1% TFA, B: Acetonitril + 0.085% TFA)
- Flussrate: 0.45 mL/min

6.2 Peptidsynthese

Harzbeladung

2-Chlortritylchloridharz (1.50-1.60 mmol/g, *mesh*: 200-400) wurde mit Fmoc-Xaa-OH beladen, indem die entsprechend geschützte Aminosäure (1.50 eq) und DIPEA (6.00 eq) in DMF (10 mL/g Harz) zugegeben wurden und das Gemisch für 5 h durchmischt wurde. Nachdem das Gemisch mehrfach mit DMF, Methanol und DCM gewaschen wurde, wurde das Harz mit einer Lösung aus DCM/Methanol/DIPEA (80:15:5) zweimal je 30 min behandelt. Anschließend erfolgte erneutes Waschen mit DMF, Methanol und DCM sowie eine abschließende Vakuumtrocknung.

Die Harzbeladung wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie bei Wellenlängen von 289 nm und 300 nm nach Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20% in DMF, 30 min) bestimmt. Dazu wurde sich der folgenden Gleichung bedient:

$$\text{Beladung} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{A_{289/300\text{nm}}}{\epsilon_{289/300\text{nm}} \cdot M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot D[\text{cm}]} \cdot \frac{V_{\text{Messkolben}}[\text{mL}]}{m_{\text{Harz}}[\text{g}]}$$

(D: Weglänge der Küvette, A: gemessene Absorption, $\epsilon_{289\text{nm}} = 5800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{300\text{nm}} = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Festphasen-Peptidsynthese

Peptide wurden in einem mikrowellenbeschleunigten Peptidsynthesizer des Typs *Liberty Blue* der Firma *CEM* synthetisiert. Das mit der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure beladene 2-Chlortritylchlorid-Harz wurde in den dafür vorgesehenen Reaktionsbehälter gegeben und durchlief dann eine sich wiederholende Abfolge aus Fmoc-Entschützung mit Piperidin (20 w% in DMF) und Aminosäurekupplung mit Oxyma/DIC. Die Spezifikationen für die Teilschritte, ausgehend von einem Ansatz von 0.1 mM bezüglich der ersten harzgebundenen Aminosäure, sind im Folgenden aufgelistet:

- **Fmoc-Entschützung:** T = 50 °C, Mikrowellenleistung = 30 W, t = 210 s mit Piperidin (20 w% in DMF, je 3.00 mL pro Entschützungsschritt)
- **Aminosäurekupplung:**
 - für alle Aminosäuren außer Arg:

T = 50 °C, P_{Mikrowelle} = 30 W, t = 600 s mit Aminosäure (0.2 M in DMF, 5.00 eq, 2.5 mL pro Kupplungsschritt), DIC (0.5 M in DMF, 5.00 eq, 1.0 mL pro Kupplungsschritt) und Oxyma (1 M in DMF, 5.00 eq, 0.5 mL)
 - für Arg: 1. T = 25 °C, P_{Mikrowelle} = 0 W, 1500 s
 2. T = 50 °C, P_{Mikrowelle} = 35 W, t = 660 s
 mit Fmoc-geschützter Aminosäure (0.2 M in DMF, 5.00 eq, 2.5 mL pro Kupplungsschritt), DIC (0.5 M in DMF, 5.00 eq, 1.0 mL pro Kupplungsschritt) und Oxyma (1 M in DMF, 5.00 eq, 0.5 mL)

Harzabspaltung

Das HV-getrocknete, harzgebundene Peptid wurde in einer Glasfritte mit einer Mischung aus TFA/H₂O/Phenol/TIPS (88:4:4:4) versetzt und die Suspension für 3 h (5 h bei Cys(Trt)-beladenen oder enthaltenden Harzen) im Stickstoffgegenstrom durchmischt. Anschließend wurde das Harz mit wenig Abspaltlösung gewaschen. Die erhaltene Lösung wurde am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Das Peptid wurde anschließend in kaltem Et₂O gefällt, zentrifugiert und zweimal mit Et₂O gewaschen. Die Rohpeptide wurde lyophilisiert und als farbloses Pulver erhalten.

Luftoxidation zur Disulfidbildung

Das aus Festphasensynthese und Harzabspaltung erhaltene Rohpeptid wurde in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (10 mM, pH = 7.4, c_{Peptid} = 1 mg/L) gelöst und zwei Tage lang bei RT in einem offenen Kolben gerührt. Mögliche unlösliche Substanzen wurden anschließend abzentrifugiert (4400 UpM, 4 °C, 3 min) und die überstehende Lösung lyophilisiert.

Aufreinigung via HPLC

Die semipräparative Aufreinigung der Peptide (je 50 mg) erfolgte an einer *Thermo Fisher Ultimate 3000 LC* Anlage, wobei folgende Bedingungen genutzt wurden:

- Säule: ACE 5 SuperC18, 150 x 10 mm
- Gradient: 15-30% B in 20 min (A: Wasser + 0.1% TFA, B: Acetonitril + 0.085% TFA)
- Flussrate: 7.00 mL/min

6.3 ELISA

Es wurden 10 µg/L Aliquote aller Peptide in Carbonat/Bicarbonat-Puffer (50 mM, pH = 9.6) hergestellt. 50 µL dieser Peptidlösungen wurden in einer Dreifachbestimmung in je ein *well* (Näpfchen) einer Mikrotiterplatte (Corning® DNA-BIND™ Surface) gegeben. Nach 2 h wurden die *wells* dreimal mit PBS-T (je 300 µL/*well*) gewaschen und anschließend die noch unbesetzten Stellen mit 2% BSA in Carbonat/Bicarbonat-Puffer (50 µL/*well*) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 300 µL/*well*) wurde die Mikrotiterplatte entweder

- a) mit einem primären RA-Antikörper (anti-CCP oder anti-Sa, 200 RE/mL Stammlösung 1/20 mit 2% BSA in PBS-T verdünnt, 50 µL/*well*, polyklonal, human) oder
- b) mit einem Patienten-Blutserum (1/200 mit 2% BSA in PBS-T verdünnt, 50 µL/*well*)

für 1 h inkubiert. Die *wells* wurden viermal mit PBS-T (je 300 µL) gewaschen und mit HRP-konjugiertem anti-human IgG (50 µL/*well*, 0.3 µg/mL, in PBS-T, Ziege) für 30 min inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit PBS-T (je 300 µL/*well*) wurden die gebundenen Spezies mit TMB-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 25 µL/*well*) durch Blaufärbung sichtbar gemacht. Die Farbreaktion wurde nach 5 min mit H₂SO₄ (5 % in Wasser, 25 µL/*well*) gestoppt. Die Absorption wurde mit einem *Thermo Fisher Multiskan GO* gemessen. Alle gemessenen Werte wurden um jeweils gemessene Blindwerte korrigiert.

Die unter a) genannten Antikörperseren wurden von der Firma *Euroimmun* (Lübeck) bezogen. Die Toleranzgrenze (*cut-off*) wurde für diese Seren von *Euroimmun* als 5 rE/mL (relative Einheiten) mittels UV-Vis-Spektroskopie festgelegt.

Die unter a) gemessenen Absorptionswerte immer relativ zum affinsten (= höchste Absorption) Referenzpeptid **1** angegeben, um eine bessere Vergleichbarkeit unter allen Peptiden und eine höhere Reproduzierbarkeit zu erlauben. Außerdem werden auf diese Weise Inhomogenitäten in den verwendeten Serenchargen berücksichtigt (Absolutwerte von Referenzpeptid **1** umfassen 0.50 bis 2.00 für die jeweiligen anti-CCP-Antikörper-Chargen). Absorptionswerte, die für die Blutseren unter b) erhalten wurden, sind als Absolutwerte angegeben

Die Ergebnisse der ELISA-Tests sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Um die statistische Signifikanz der jeweils drei unabhängigen Experimente zu bewerten, wurde ein

zweiseitiger *Student t*-Test angewendet. Folgende Definitionen werden dabei verwendet: $P > 0.05$ (n.s.), $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) oder $P < 0.001$ (***).

Zustimmung der Ethikkommission und Umgang mit den Blutseren

Alle ELISA-Experimente mit Blutseren wurden in Übereinstimmung mit den relevanten Gesetzen und institutionellen Richtlinien durchgeführt. Ein positives Votum wurde durch die medizinische Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg erteilt. Die Entnahme von Blutseren wurde dementsprechend durch die Kommission erlaubt und von medizinisch geschultem Personal des Rheuma-Zentrums Mittelhessen (Bad Endbach) durchgeführt. Alle Patienten wurden über die Prozedur informiert und gaben ihr Einverständnis.

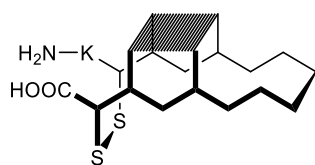
6.4 Molekulardynamik-Simulation

NMR-basierte Modelle der Peptide wurden mit dem Programm *HyperChem* mit MM+ Kraftfeld, aber ohne explizites Wasser,^[361] erstellt.^[255,362] NOE-Kontakte, Wasserstoffbrücken und Seitenketten-Rotamere wurden aus den NMR-Daten gewonnen und als Zielwerte im Modelling festgelegt. Abschließend wurden die Strukturen energieminiert.^[363]

6.5 Analytische Daten der synthetisierten Peptide

Alle Peptide wurden nach der in Kapitel 6.2 beschriebenen Methode synthetisiert. Die Verschiebungszuordnung der ^1H -NMR-Signale erfolgte mittels ^1H -NMR-, TOCSY- und NOESY-Spektren. Die NMR-Spektren wurden mit Wasserunterdrückung (***WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation***, WATERGATE) gemessen. Angegeben sind die Sequenz sowie eine schematische Zickzack-Darstellung der *hairpin*-Struktur eines jeden Peptids und seiner sequenzselektiven Besonderheiten. Es folgt jeweils die Zuordnung aller Signale in Tabellenform (für Peptide ohne Vorzugskonformation, erkennbar an einer geringen Signaldispersion, entfällt diese Zuordnung) mit zugehörigem pH-Wert und Messbedingungen sowie eine Abbildung des ^1H -NMR-Spektrums. Anschließend ist ein HPLC-Chromatogramm abgebildet sowie die gemessene exakte Masse des Peptids dokumentiert.

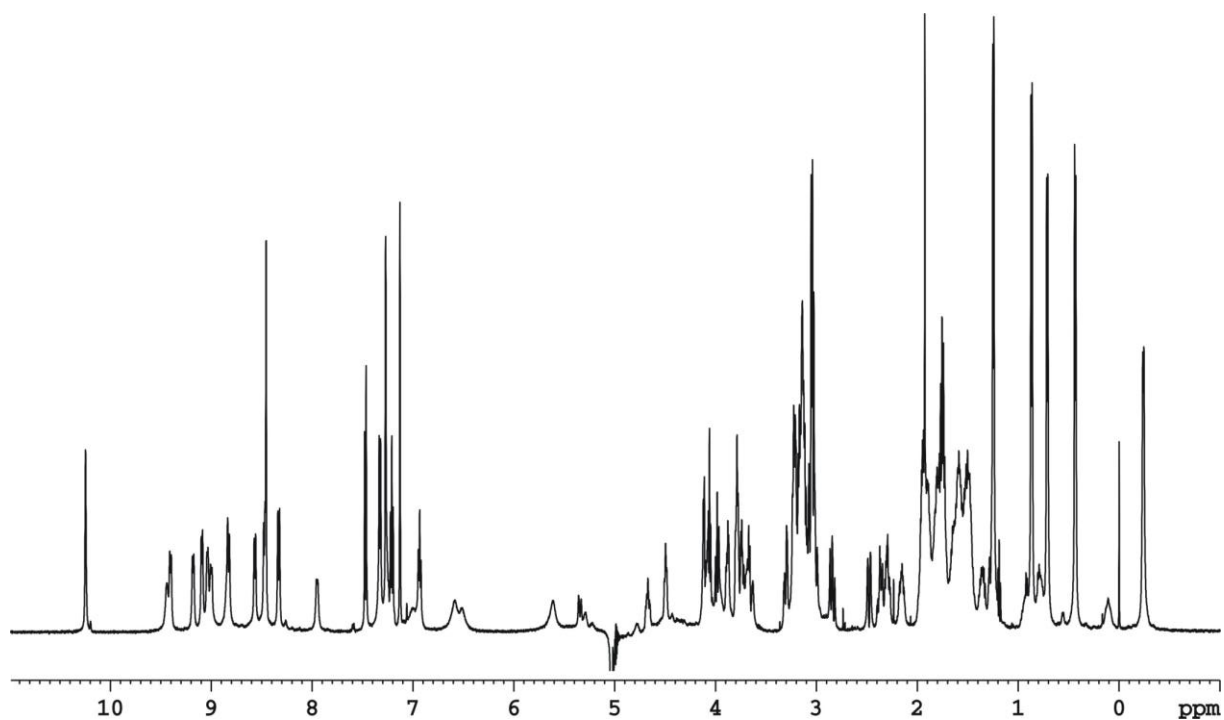
Peptid 1



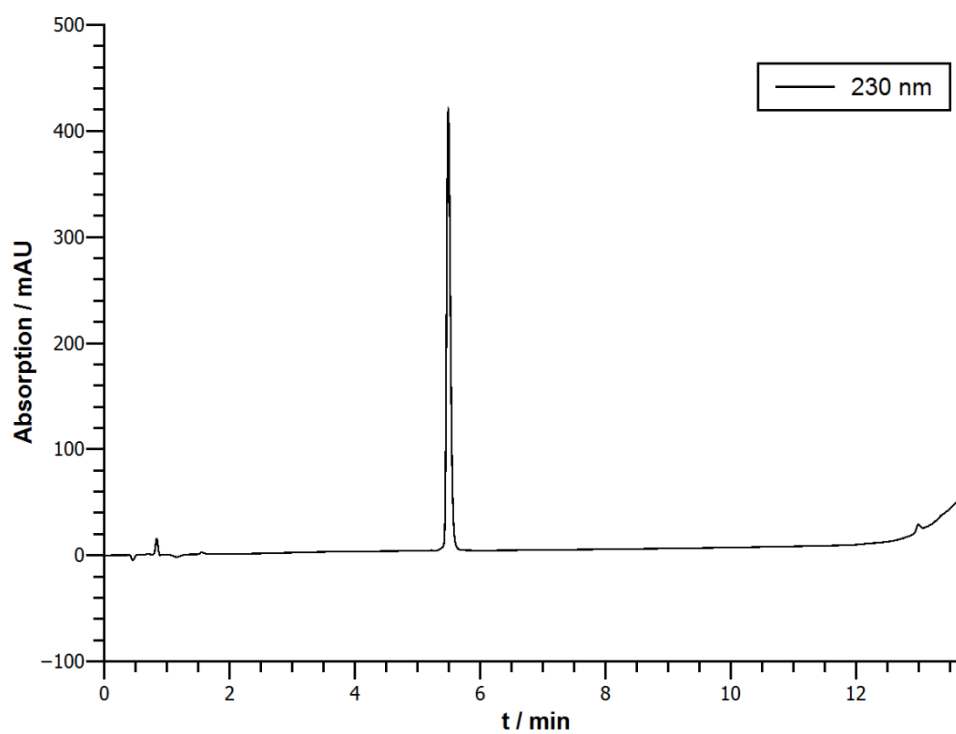
H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.06	1.94	1.50	δ: 1.75, ε: 3.03	-
Cys ¹	5.33	3.00, 2.48	-	-	n/a
His ²	4.86	3.31, 3.19	-	aromatisch: δ ² : 7.14, ε ¹ : 8.46	9.10
Trp ³	4.95	3.15, 3.04	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.23, 4: 7.34, 7: 7.47, 5: 6.93, 6: 7.21	9.04
Glu ⁴	4.79	2.15, 1.87	2.37, 2.30	-	9.41
Ser ⁵	5.23	3.78, 3.74	-	-	9.00
Thr ⁶	4.49	4.11	1.25	-	8.56
Cit ⁷	3.97	1.96, 1.80	1.58, 1.50	δ: 3.14 ε(NH): 6.51	9.44
Gly ⁸	4.11, 3.65	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.68	1.90, 1.82	1.63	δ: 3.22, ε(NH): 7.33	7.94
Ser ¹⁰	5.29	3.88, 3.78	-	-	8.84
Arg ¹¹	4.77	1.76	1.58, 1.47	δ: 3.13 ε(NH): 7.26	9.18
Leu ¹²	3.67	1.25, 0.09	0.77	δ: 0.43, -0.25	8.47
Val ¹³	4.00	1.34	0.87, 0.71	-	8.83
Cys ¹⁴	4.67	3.06, 2.83	-	-	8.33

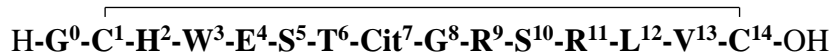
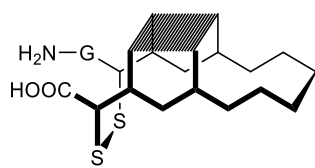


HPLC: $t_R = 5.49$ min

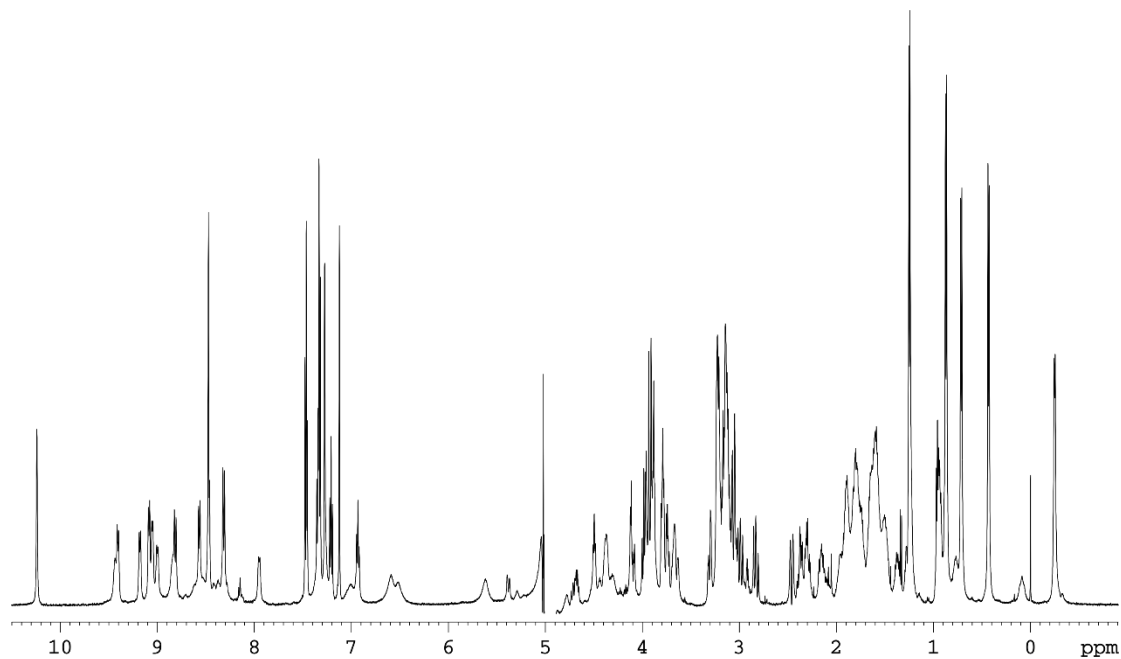


HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_{22}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9379.

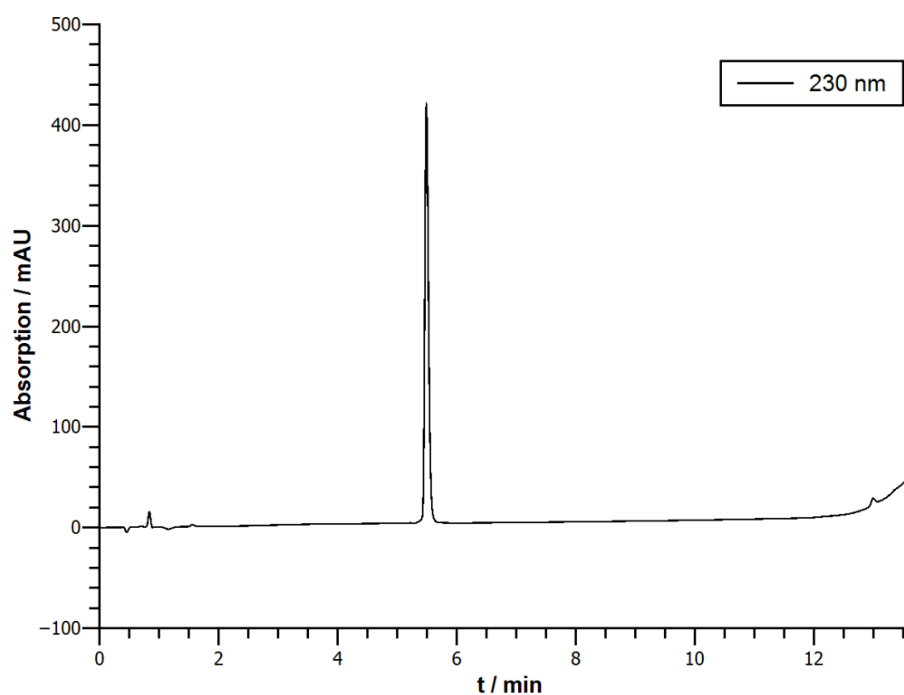
Peptid 2



¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

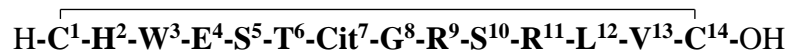
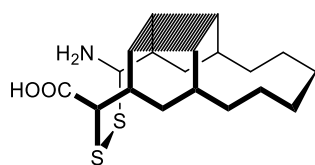


HPLC: $t_R = 5.91$ min



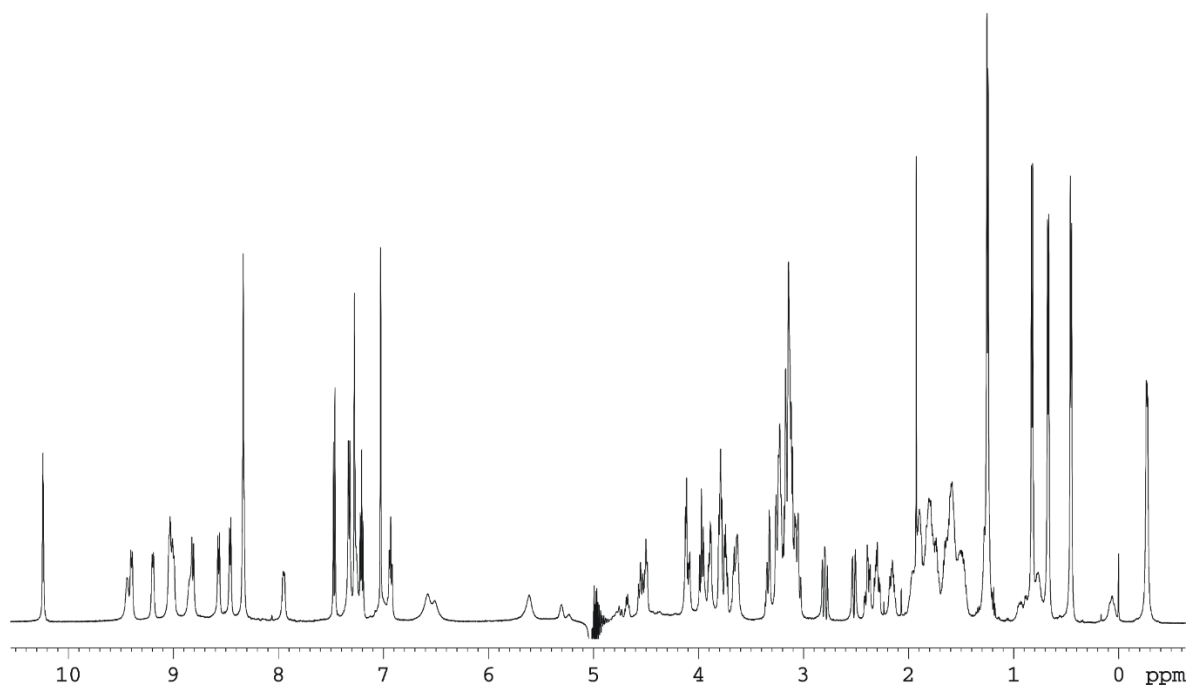
HR-MS (ESI⁺): für [C₇₁H₁₁₂N₂₆O₂₂S₂+2H]²⁺, ber.: 873.4016, gef.: 873.4011.

Peptid 3

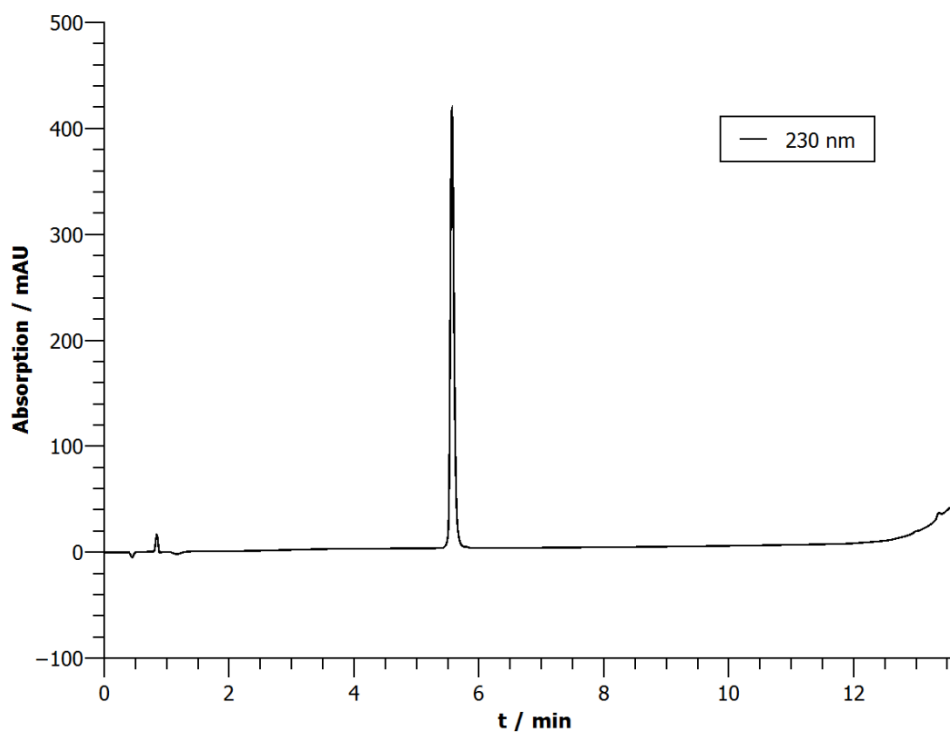


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Cys ¹	4.72	3.08, 2.52	-	-	n/a
His ²	4.86	3.32, 3.23	-	aromatisch: δ ² : 7.03, ε ¹ : 8.34	9.01
Trp ³	4.95	3.15, 3.05	-	aromatisch: 2: 7.28, 1(NH): 10.23, 4: 7.33, 7: 7.47, 5: 6.93, 6: 7.21	9.03
Glu ⁴	4.80	2.15, 1.87	2.37, 2.30	-	9.40
Ser ⁵	5.23	3.76	-	-	9.00
Thr ⁶	4.50	4.12	1.25	-	8.56
Cit ⁷	3.96	1.96, 1.80	1.56, 1.48	δ: 3.14 ε(NH): 6.51	9.44
Gly ⁸	4.10, 3.65	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.68	1.90, 1.82	1.61	δ: 3.22, ε(NH): 7.33	7.94
Ser ¹⁰	5.31	3.88, 3.78	-	-	8.84
Arg ¹¹	4.75	1.75	1.57, 1.45	δ: 3.15 ε(NH): 7.26	9.19
Leu ¹²	3.62	1.23, 0.07	0.75	δ: 0.46, -0.27	8.46
Val ¹³	4.00	1.24	0.83, 0.68	-	8.82
Cys ¹⁴	4.53	3.15, 2.78	-	-	8.33

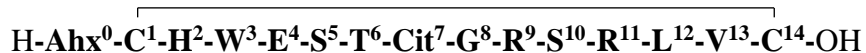
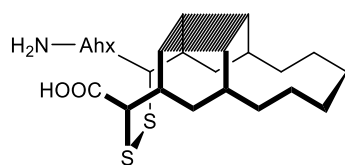


HPLC: $t_R = 5.56 \text{ min}$



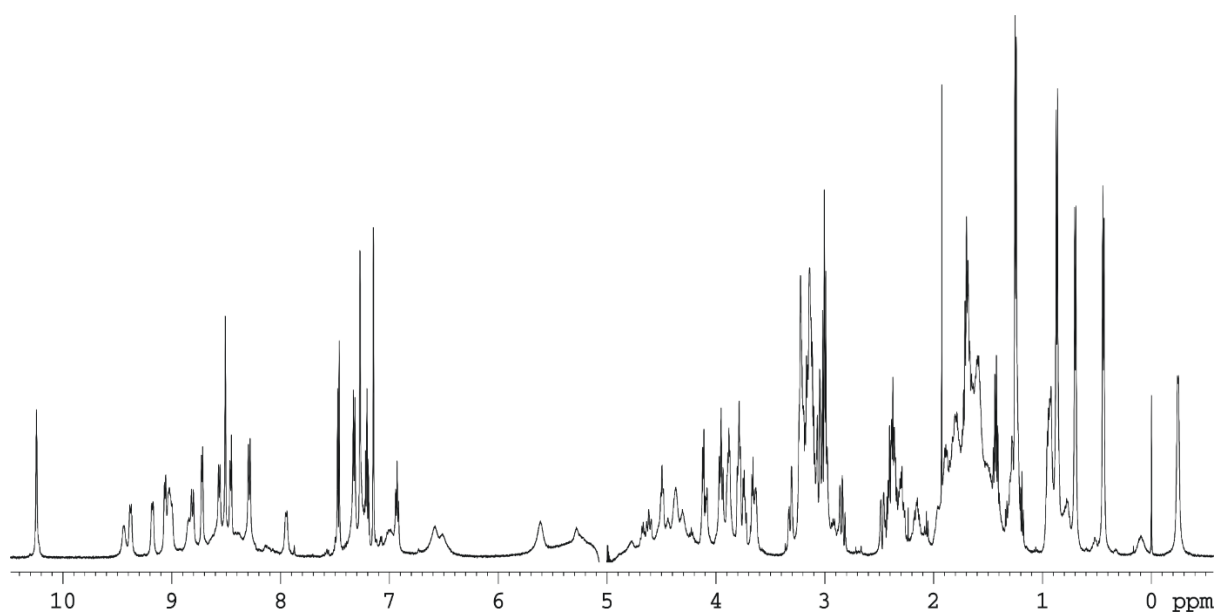
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{69}\text{H}_{109}\text{N}_{25}\text{O}_{21}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 844.8908, gef.: 844.8924.

Peptid 4

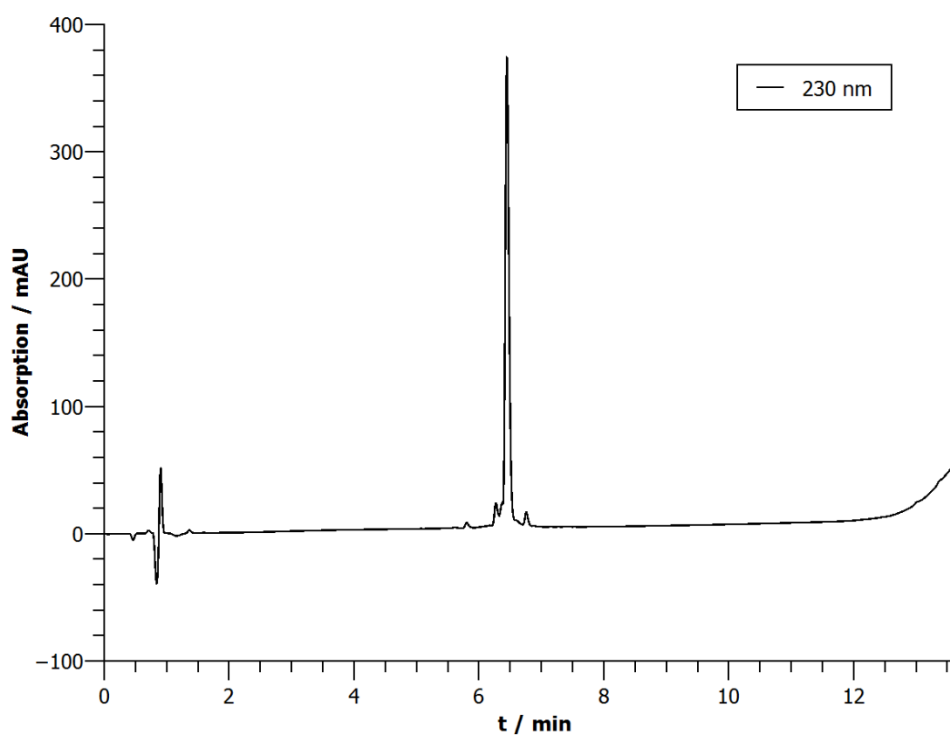


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Ahx ⁰	2.38	1.69	1.41	δ: 1.69, ε: 3.00	-
Cys ¹	5.27	3.00, 2.48	-	-	8.72
His ²	4.86	3.30, 3.19	-	aromatisch: δ ² : 7.15, ε ¹ : 8.51	9.06
Trp ³	4.95	3.15, 3.04	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.25, 4: 7.33, 7: 7.47, 5: 6.93, 6: 7.21	9.02
Glu ⁴	4.79	2.15, 1.87	2.36, 2.29	-	9.38
Ser ⁵	5.23	3.77	-	-	9.00
Thr ⁶	4.49	4.11	1.23	-	8.56
Cit ⁷	3.97	1.96, 1.80	1.58, 1.50	δ: 3.14 ε(NH): 6.51	9.44
Gly ⁸	4.10, 3.67	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.68	1.90, 1.82	1.63	δ: 3.22, ε(NH): 7.33	7.94
Ser ¹⁰	5.27	3.88, 3.78	-	-	8.84
Arg ¹¹	4.77	1.74	1.58, 1.47	δ: 3.15 ε(NH): 7.26	9.18
Leu ¹²	3.65	1.25, 0.10	0.77	δ: 0.44, -0.24	8.46
Val ¹³	3.96	1.30	0.86, 0.68	-	8.81
Cys ¹⁴	4.60	3.06, 2.83	-	-	8.28

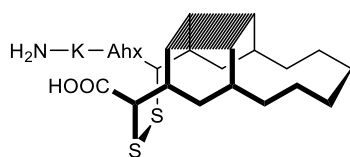


HPLC: $t_R = 6.44$ min



HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{120}N_{26}O_{22}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 901.4329, gef.: 901.4335.

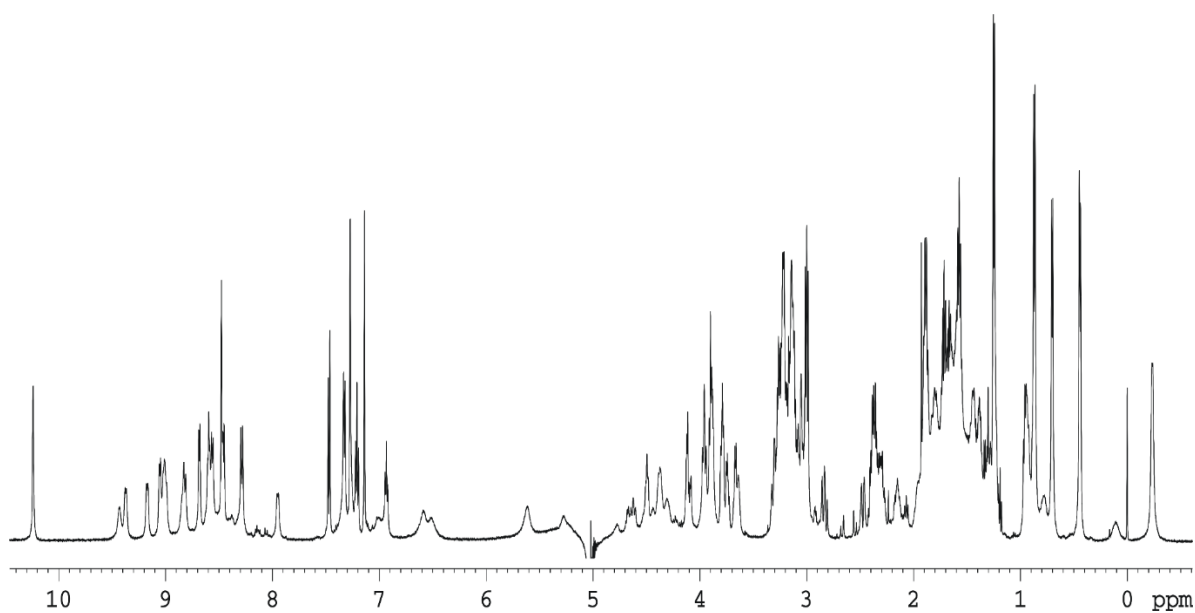
Peptid 5



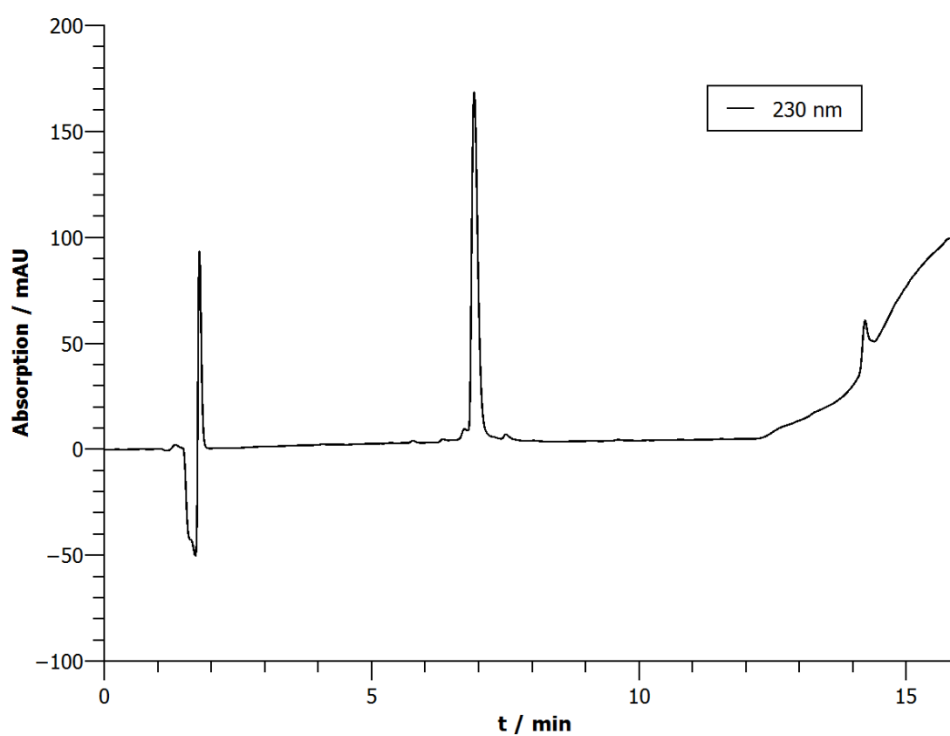
H-Lys⁻¹-Ahx⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁻¹	3.90	1.90	1.44	δ: 1.70, ε: 3.00	-
Ahx ⁰	2.34	1.58	1.37	δ: 1.67, ε: 3.25	8.60
Cys ¹	5.27	3.00, 2.48	-	-	8.69
His ²	4.90	3.30, 3.19	-	aromatisch: δ ² : 7.14, ε ¹ : 8.48	9.06
Trp ³	4.95	3.15, 3.04	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.25, 4: 7.33, 7: 7.47, 5: 6.93, 6: 7.21	9.02
Glu ⁴	4.79	2.15, 1.87	2.36, 2.29	-	9.38
Ser ⁵	5.23	3.77	-	-	8.99
Thr ⁶	4.49	4.11	1.23	-	8.56
Cit ⁷	3.97	1.86	1.58, 1.50	δ: 3.14 ε(NH): 6.51	9.44
Gly ⁸	4.10, 3.65	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.68	1.90, 1.82	1.63	δ: 3.22, ε(NH): 7.33	7.94
Ser ¹⁰	5.27	3.89, 3.80	-	-	8.84
Arg ¹¹	4.77	1.74	1.58, 1.47	δ: 3.15 ε(NH): 7.26	9.18
Leu ¹²	3.67	1.25, 0.10	0.77	δ: 0.44, -0.24	8.46
Val ¹³	3.96	1.30	0.86, 0.70	-	8.81
Cys ¹⁴	4.64	3.06, 2.83	-	-	8.28

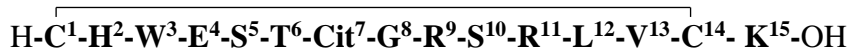
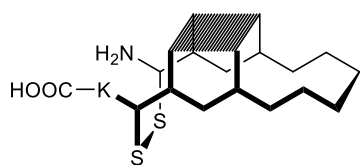


HPLC: $t_R = 6.91$ min (Säule: ACE 3 C18, 150 x 3.0 mm, Gradient: 15-30% B in 10 min
Flussrate: 0.60 mL/min)



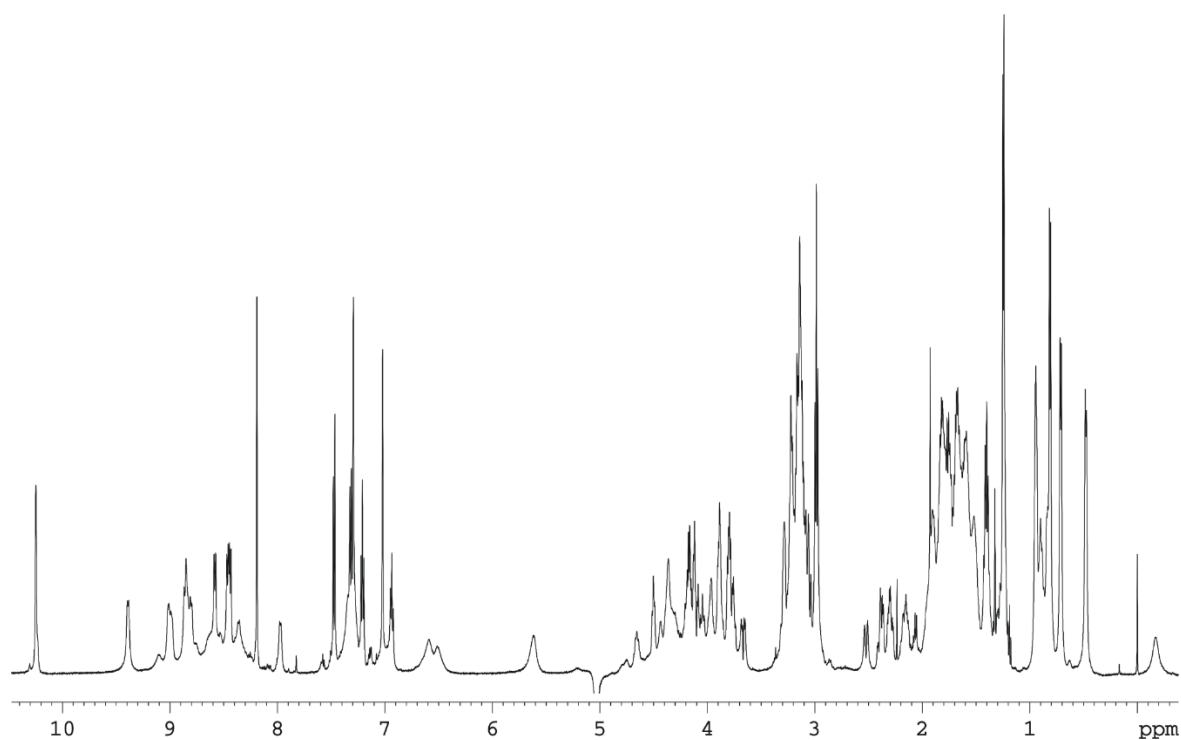
HR-MS (ESI+): für $[C_{81}H_{132}N_{28}O_{23}S_2 + 2H]^{2+}$, ber.: 965.9817, gef.: 965.9829.

Peptid 6

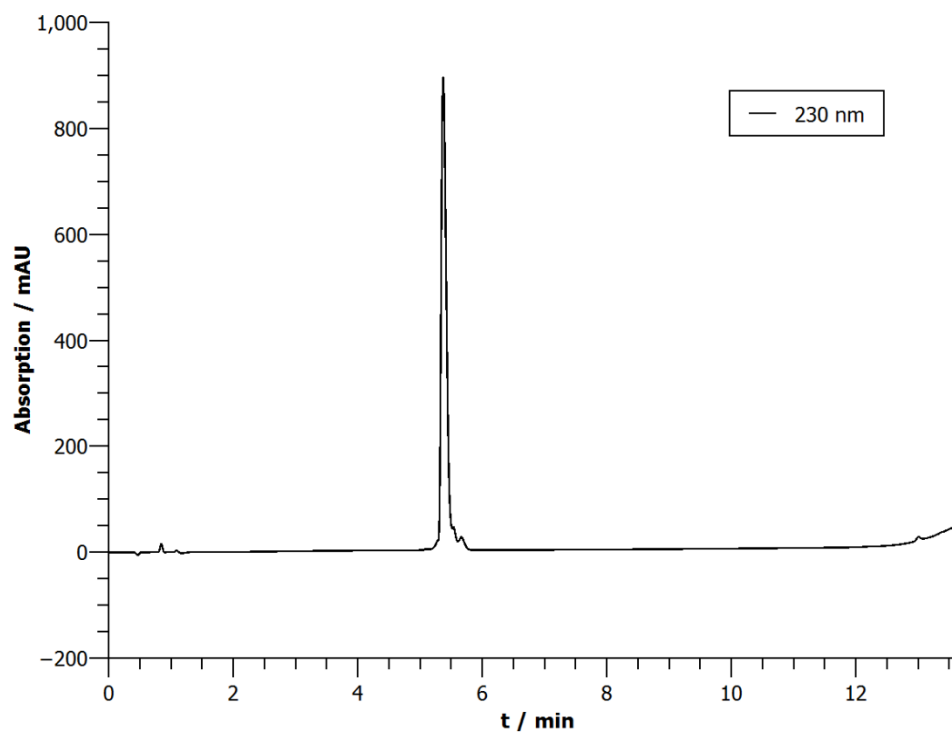


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Cys ¹	n/a	3.07, 2.52	-	-	-
His ²	4.88	n/a	-	aromatisch: δ ² : 7.03, ε ¹ : 8.21	n/a
Trp ³	4.95	3.15, 3.06	-	aromatisch: 2: 7.29, 1(NH): 10.23, 4: 7.33, 7: 7.48, 5: 6.94, 6: 7.20	9.02
Glu ⁴	4.86	2.16, 1.89	2.38, 2.30	-	9.46
Ser ⁵	5.20	3.78	-	-	8.98
Thr ⁶	4.51	4.12	1.25	-	8.59
Cit ⁷	3.99	1.96, 1.80	1.56	δ: 3.13 ε(NH): 6.52	n/a
Gly ⁸	4.10, 3.67	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.66	1.91, 1.82	1.61	δ: 3.23 ε(NH): 7.34	7.97
Ser ¹⁰	5.22	3.89, 3.81	-	-	8.83
Arg ¹¹	4.75	1.77	1.59, 1.49	δ: 3.15 ε(NH): 7.27	9.10
Leu ¹²	3.65	0.93, 0.18	0.83	δ: 0.48, -0.17	8.46
Val ¹³	4.05	1.37	0.81, 0.71	-	8.87
Cys ¹⁴	4.79	3.15, 2.73	-	-	8.81
Lys ¹⁵	4.17	1.81	1.39	δ: 1.75 ε: 2.99	8.44

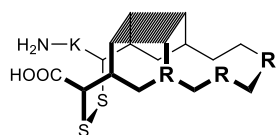


HPLC: $t_R = 5.37$ min



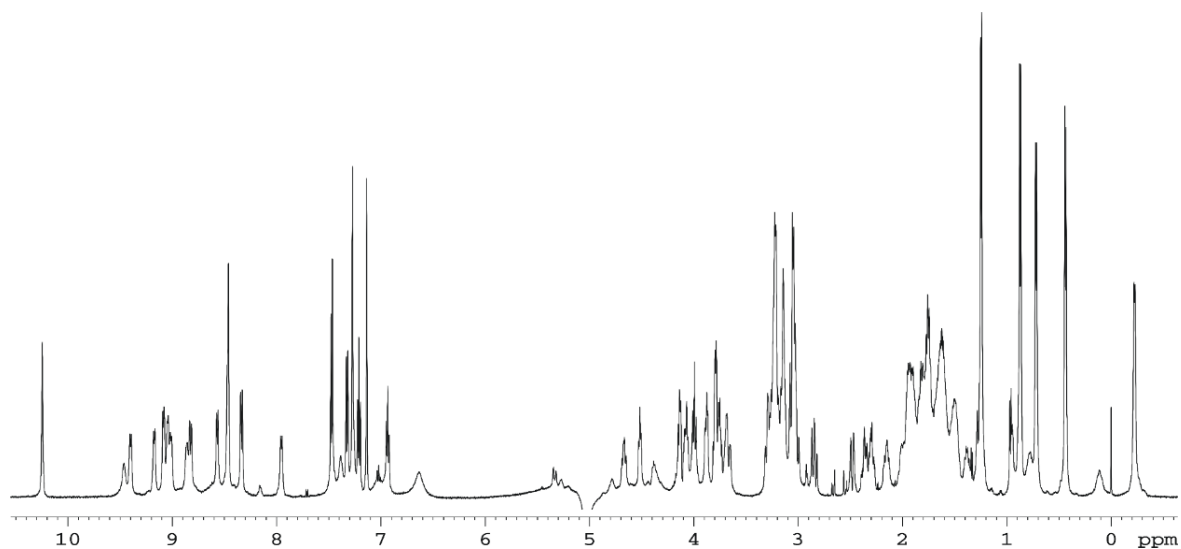
HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{121}N_{27}O_{22}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9408.

Peptid 7

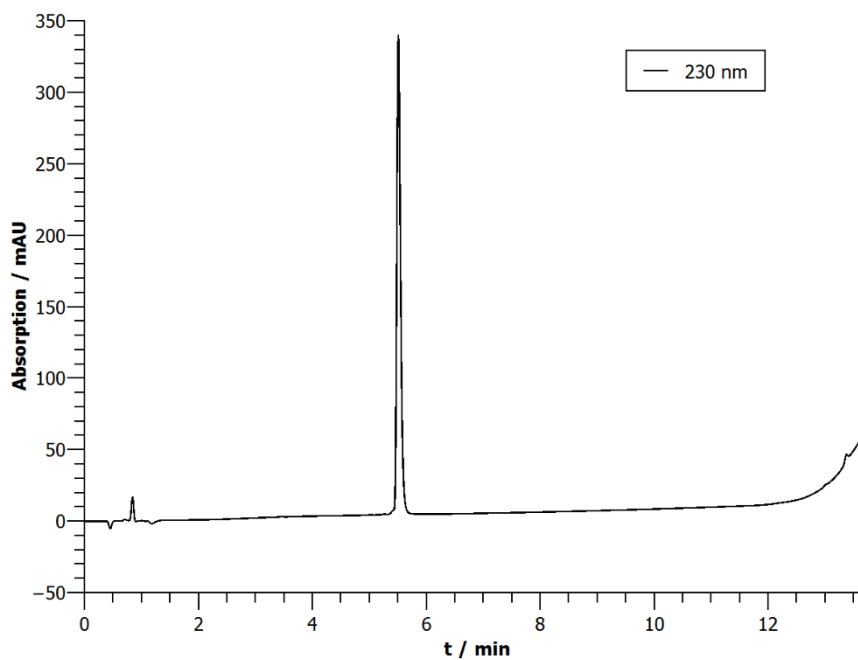


H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-R⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

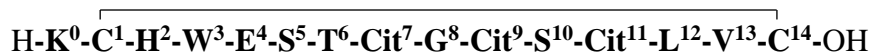
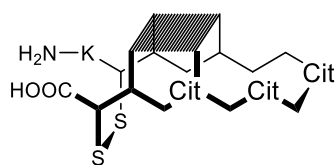


HPLC: $t_R = 5.50$ min



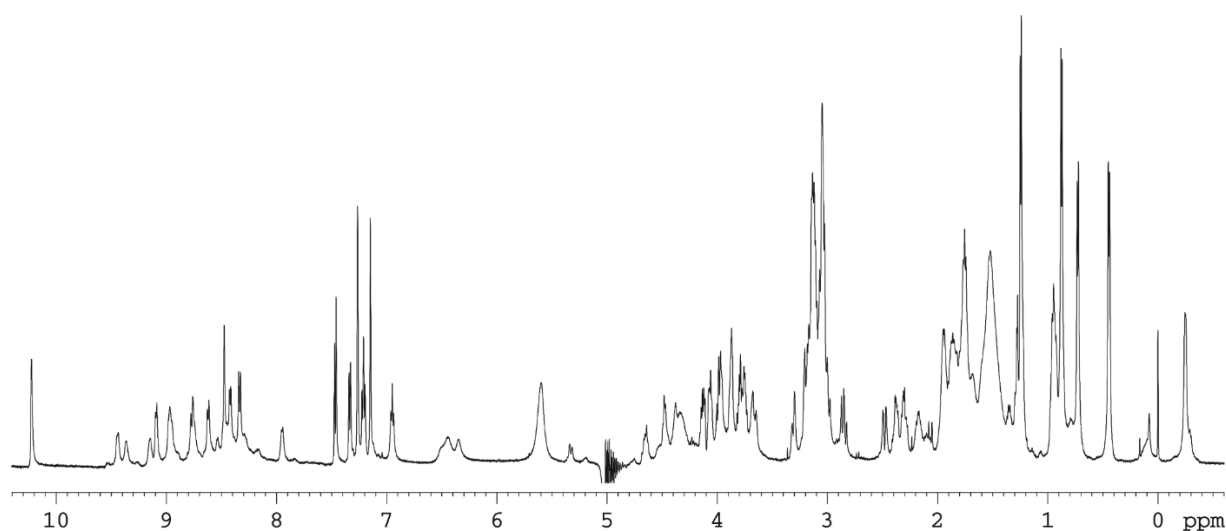
HR-MS (ESI⁺): für [C₇₅H₁₂₂N₂₈O₂₁S₂+3H]³⁺, ber.: 605.9666, gef.: 605.9660.

Peptid 8

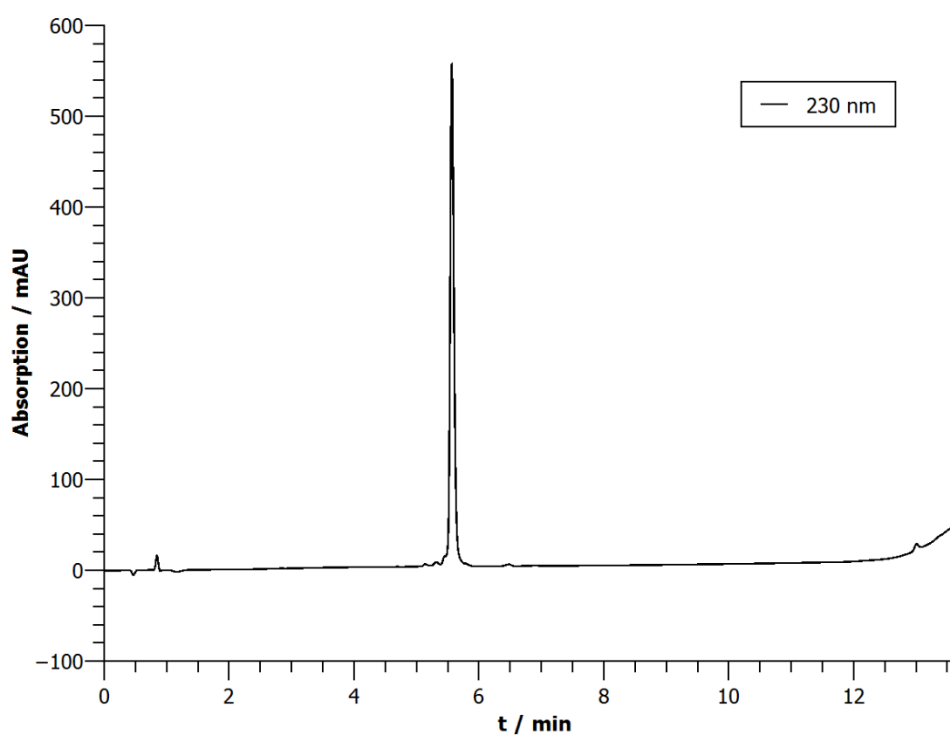


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.06	1.94	1.50	δ: 1.75, ε: 3.03	-
Cys ¹	5.35	3.00, 2.48	-	-	n/a
His ²	4.86	3.31, 3.17	-	aromatisch: δ ² : 7.14, ε ¹ : 8.48	9.10
Trp ³	4.98	3.13, 3.05	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.23, 4: 7.34, 7: 7.47, 5: 6.95, 6: 7.21	8.98
Glu ⁴	4.79	2.17, 1.87	2.38, 2.31	-	9.45
Ser ⁵	5.20	3.77	-	-	8.96
Thr ⁶	4.47	4.11	1.25	-	8.62
Cit ⁷	3.97	1.95, 1.81	1.54	δ: 3.09 ε(NH): 6.52	9.37
Gly ⁸	4.10, 3.66	-	-	-	n/a
Cit ⁹	4.64	1.88, 1.79	1.51	δ: 3.13, ε(NH): 6.44	7.94
Ser ¹⁰	5.19	3.88, 3.78	-	-	8.74
Cit ¹¹	4.77	1.76, 1.68	1.43	δ: 3.05 ε(NH): 6.35	9.15
Leu ¹²	3.67	1.26, 0.10	0.77	δ: 0.45, -0.25	8.42
Val ¹³	3.98	1.34	0.87, 0.71	-	8.76
Cys ¹⁴	4.67	3.06, 2.84	-	-	8.33

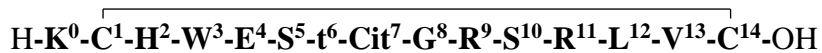
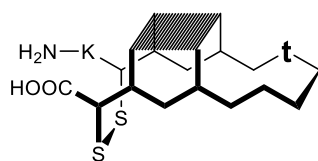


HPLC: $t_R = 5.56$ min



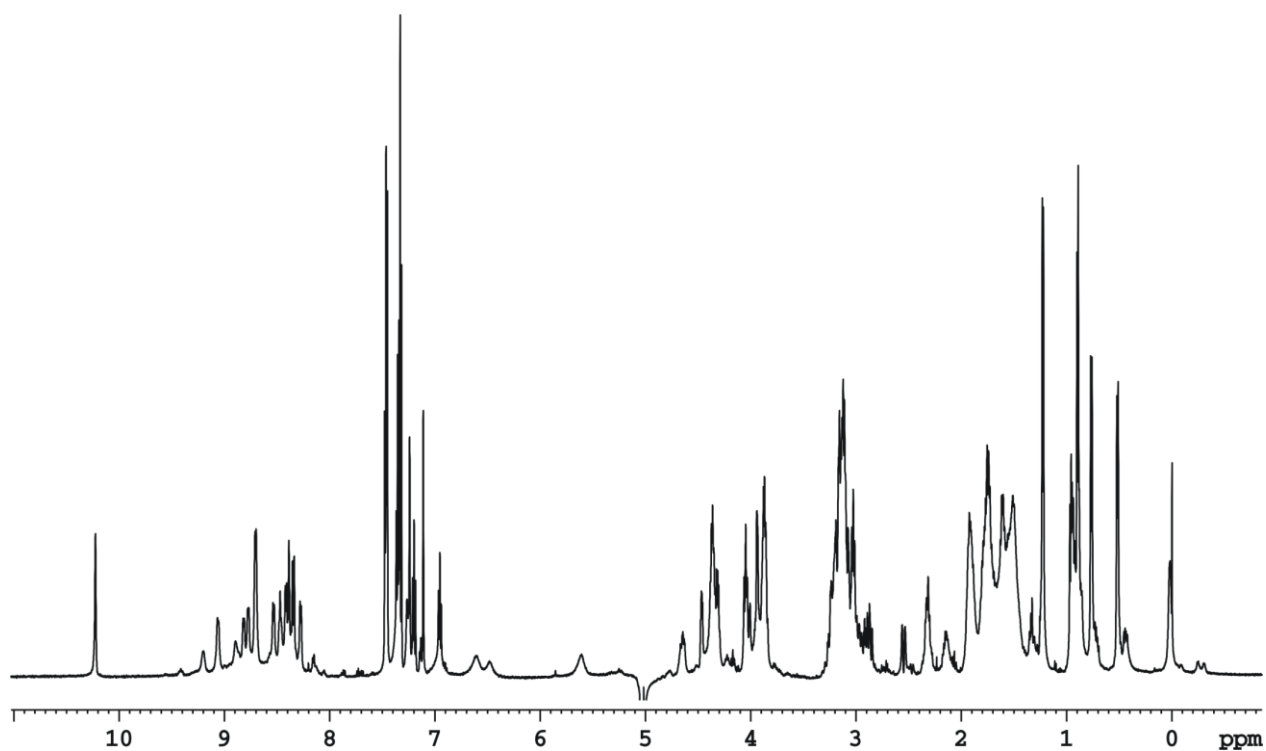
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{119}\text{N}_{25}\text{O}_{24}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 909.9223, gef.: 909.9252.

Peptid 9

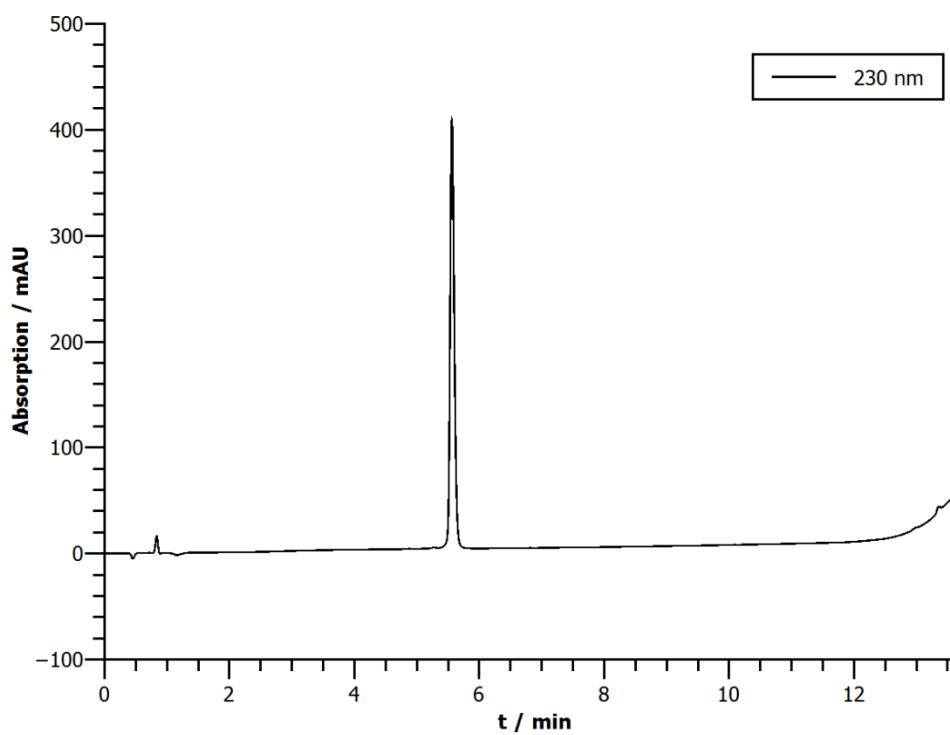


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.06	1.93	1.49	δ: 1.74, ε: 3.02	-
Cys ¹	5.26	2.97, 2.55	-	-	n/a
His ²	4.84	3.27, 3.19	-	aromatisch: δ ² : 7.12, ε ¹ : 8.42	9.08
Trp ³	4.87	3.17, 3.08	-	aromatisch: 2: 7.24, 1(NH): 10.23, 4: 7.36, 7: 7.47, 5: 6.95, 6: 7.20	8.91
Glu ⁴	4.68	2.16, 1.90	2.32	-	9.22
Ser ⁵	4.78	3.94	-	-	8.78
thr ⁶	4.47	4.30	1.22	-	8.53
Cit ⁷	4.34	1.91, 1.74	1.55, 1.50	δ: 3.11 ε(NH): 6.48	8.90
Gly ⁸	4.02, 3.86	-	-	-	8.46
Arg ⁹	4.37	1.77	1.60	δ: 3.21 ε(NH): 7.36	8.26
Ser ¹⁰	4.76	3.87	-	-	8.69
Arg ¹¹	4.64	1.78, 1.70	1.54	δ: 3.13, ε(NH): 7.26	8.71
Leu ¹²	3.85	1.31, 0.39	0.94	δ: 0.51, 0.00	8.42
Val ¹³	4.02	1.48	0.90, 0.75	-	8.70
Cys ¹⁴	4.65	3.08, 2.86	-	-	8.35

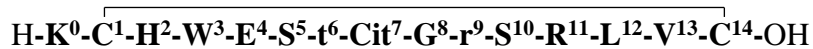
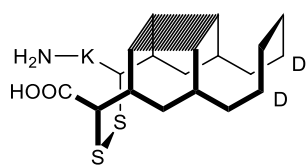


HPLC: $t_R = 5.56 \text{ min}$



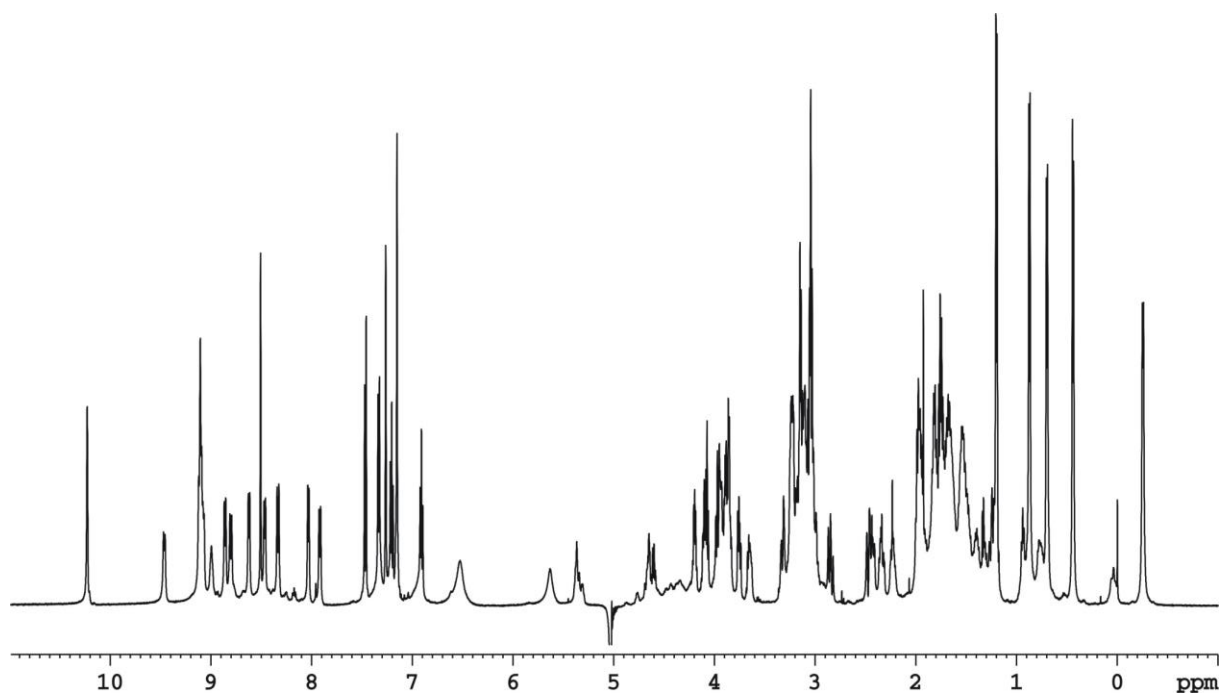
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_{22}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9394.

Peptid 10

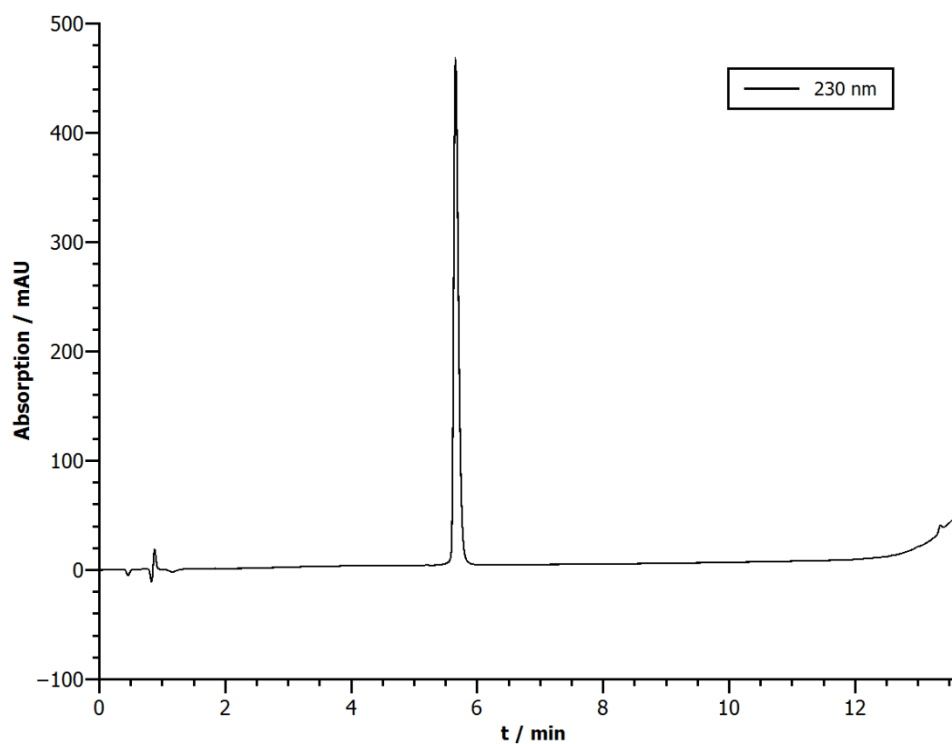


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.07	1.96	1.50	δ: 1.75, ε: 3.04	-
Cys ¹	5.37	3.00, 2.47	-	-	n/a
His ²	4.88	3.32, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 7.15, ε ¹ : 8.51	9.09
Trp ³	4.95	3.16, 3.04	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.23, 4: 7.33, 7: 7.46, 5: 6.91, 6: 7.20	9.07
Glu ⁴	4.86	2.22, 1.83	2.42, 2.35	-	9.46
Ser ⁵	5.38	3.88, 3.84	-	-	8.86
thr ⁶	4.65	4.18	1.20	-	8.03
Cit ⁷	4.09	1.82	1.63, 1.56	δ: 3.13 ε(NH): 6.52	9.10
Gly ⁸	3.93	-	-	-	8.99
arg ⁹	4.61	1.98	1.66	δ: 3.23 ε(NH): 7.32	7.92
Ser ¹⁰	5.32	3.87, 3.75	-	-	8.62
Arg ¹¹	4.75	1.76, 1.68	1.53, 1.38	δ: 3.10 ε(NH): 7.15	9.10
Leu ¹²	3.65	1.24, 0.04	0.76	δ: 0.44, -0.25	8.46
Val ¹³	3.96	1.31	0.87, 0.70	-	8.80
Cys ¹⁴	4.66	3.05, 2.85	-	-	8.33

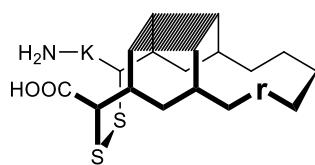


HPLC: $t_R = 5.66$ min



HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_{22}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9409.

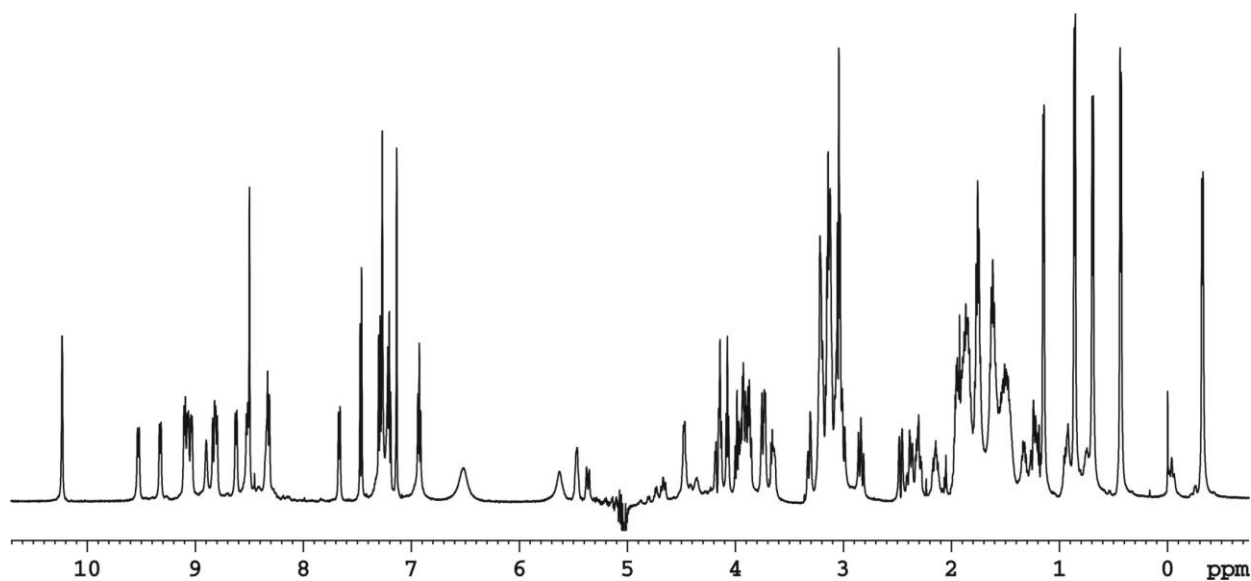
Peptid 11



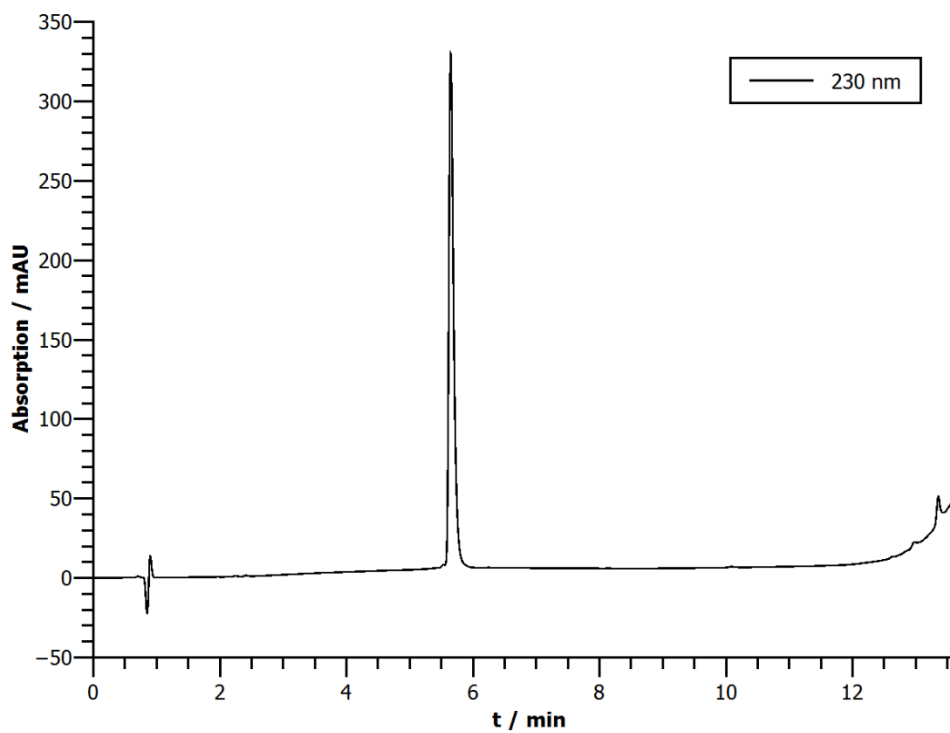
H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-r⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.07	1.95	1.50	δ: 1.75, ε: 3.04	-
Cys ¹	5.37	3.01, 2.47	-	-	n/a
His ²	4.87	3.32, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 7.13, ε ¹ : 8.50	9.09
Trp ³	4.97	3.13, 3.06	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 9.77, 4: 7.13, 7: 7.47, 5: 6.94, 6: 7.21	9.06
Glu ⁴	4.88	2.14, 1.87	2.38, 2.31	-	9.53
Ser ⁵	4.92	3.93, 3.87	-	-	9.03
Thr ⁶	4.81	4.47	1.13	-	8.63
Cit ⁷	4. ¹⁴	1.83	1.59	δ: 3.15 ε(NH): 6.53	8.90
Gly ⁸	4.16, 3.78	-	-	-	8.34
arg ⁹	4.74	1.87	1.60	δ: 3.21 ε(NH): 7.27	7.67
Ser ¹⁰	5.47	3.91, 3.74	-	-	8.80
Arg ¹¹	4.87	1.75	1.45	δ: 3.03, ε(NH): 7.22	9.32
Leu ¹²	3.65	1.24, -0.04	0.74	δ: 0.44, -0.32	8.52
Val ¹³	3.98	1.32	0.85, 0.69	-	8.91
Cys ¹⁴	4.67	3.04, 2.83	-	-	8.32

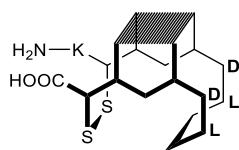


HPLC: $t_R = 5.65$ min



HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_{22}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9389.

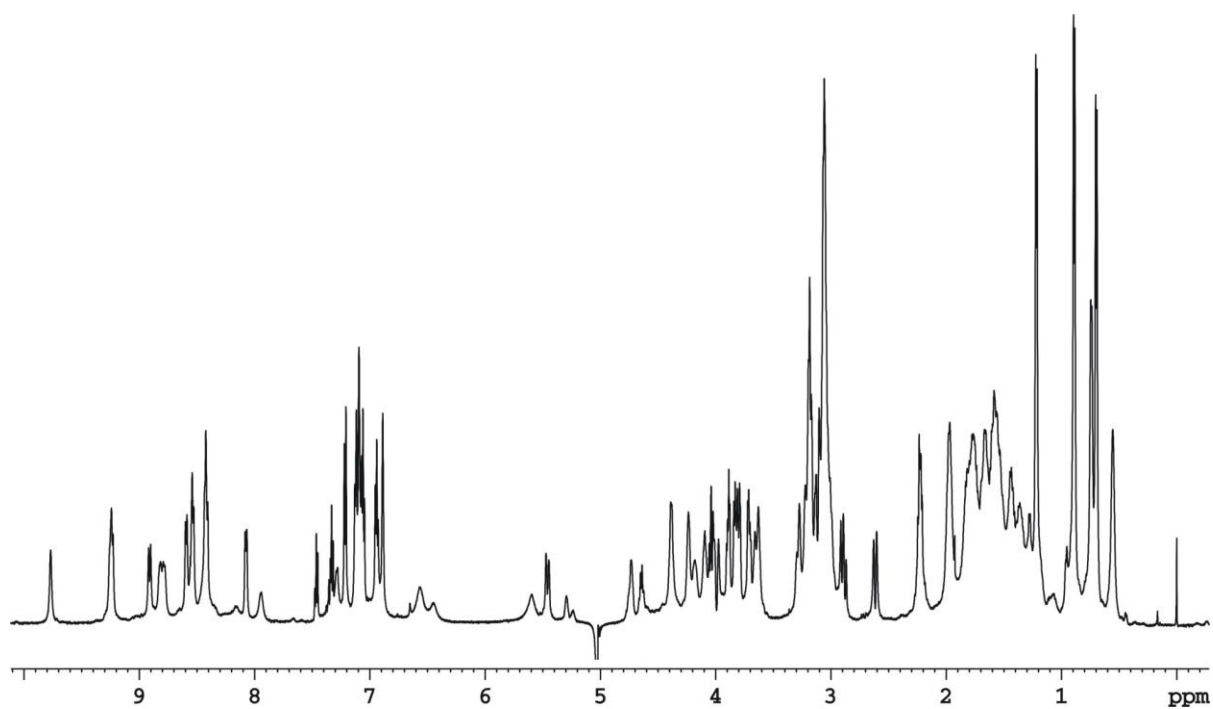
Peptid 12



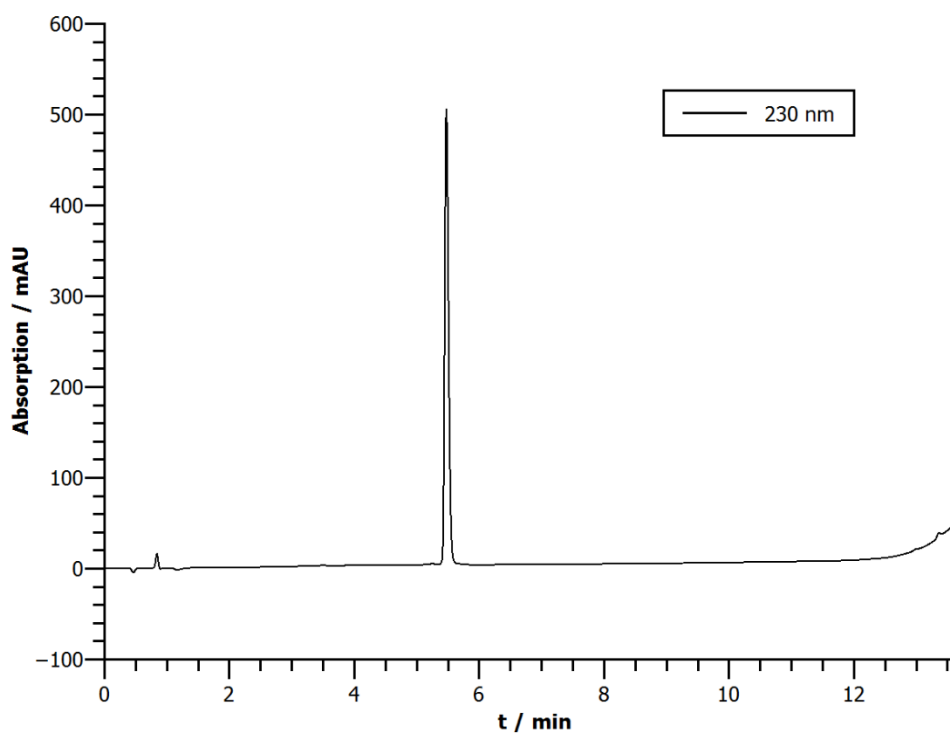
H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.09	1.96	1.51	δ: 1.76, ε: 3.05	-
Cys ¹	5.46	3.16, 2.62	-	-	n/a
His ²	4.88	3.27, 3.22	-	aromatisch: δ ² : 7.15, ε ¹ : 8.51	9.23
Trp ³	4.73	3.04	-	aromatisch: 2: 6.89, 1(NH): 9.77, 4: 7.22, 7: 7.13, 5: 6.94, 6: 7.06	9.24
Glu ⁴	4.64	1.94, 1.78	2.22	-	8.78
ser ⁵	5.23	3.87, 3.83	-	-	8.53
Thr ⁶	4.71	4.39	1.20	-	8.82
Cit ⁷	3.62	1.64	1.43, 1.33	δ: 3.04 ε(NH): 6.45	8.55
Gly ⁸	3.99, 3.63	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.74	1.82, 1.74	1.57	δ: 3.17 ε(NH): 7.29	8.08
ser ¹⁰	5.28	3.79, 3.71	-	-	8.59
Arg ¹¹	4.24	1.68, 1.53	1.34, 1.16	δ: 3.03, ε(NH): 7.08	7.94
Leu ¹²	4.18	1.57, 1.06	1.27	δ: 0.74, 0.55	8.43
Val ¹³	4.03	1.42	0.87, 0.69	-	8.91
Cys ¹⁴	4.75	3.12, 2.91	-	-	8.41



HPLC: $t_R = 5.47$ min

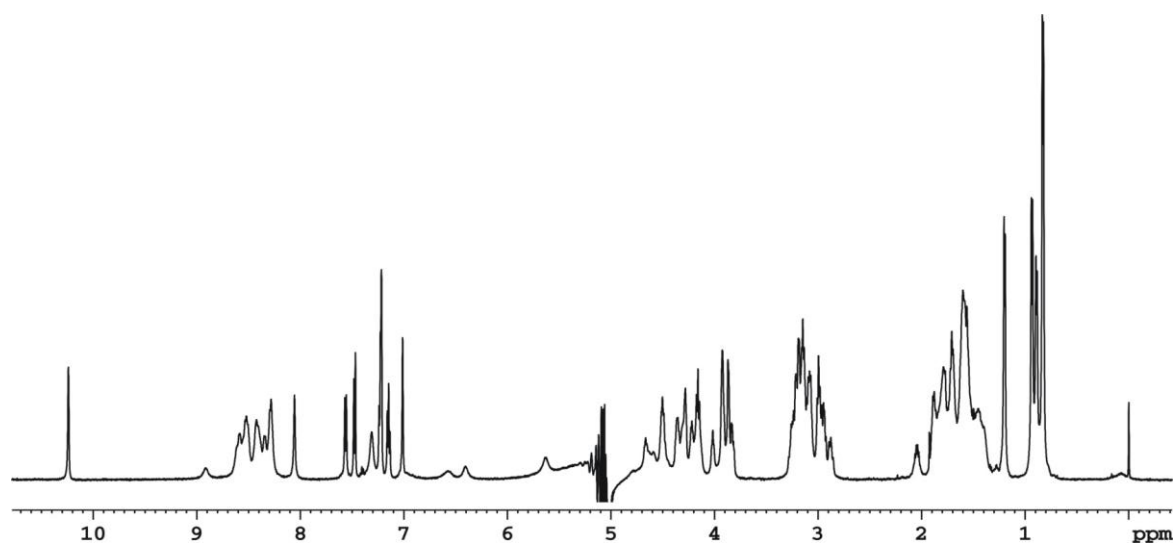


HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{121}N_{27}O_{22}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9416.

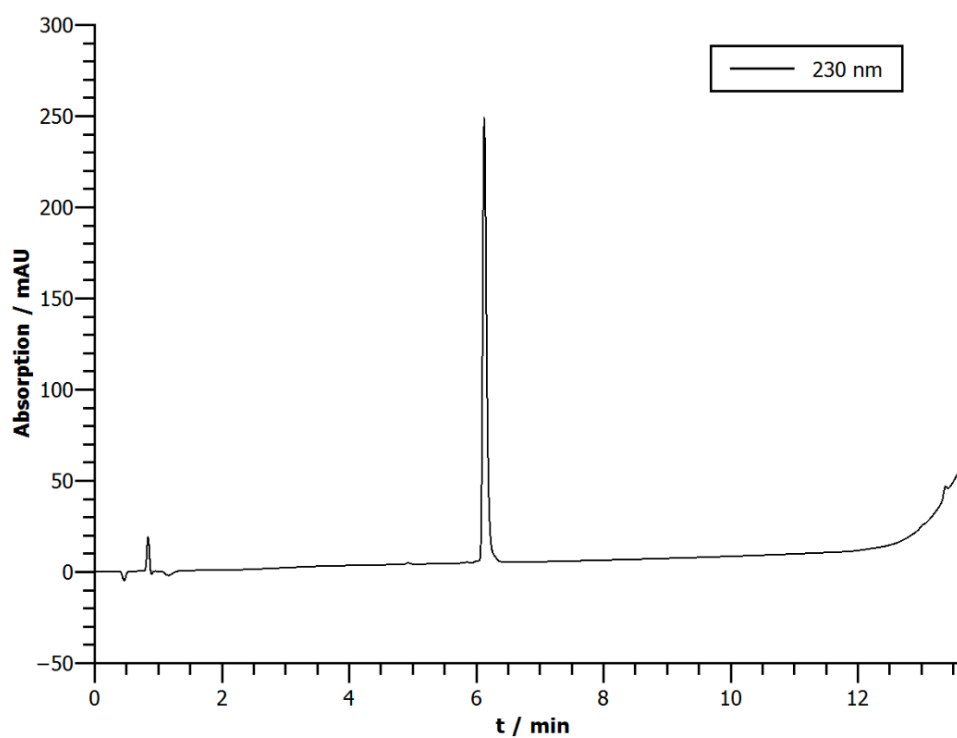
Peptid 13

H-K⁰-C¹-H²-W³-e⁴-S⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-r¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

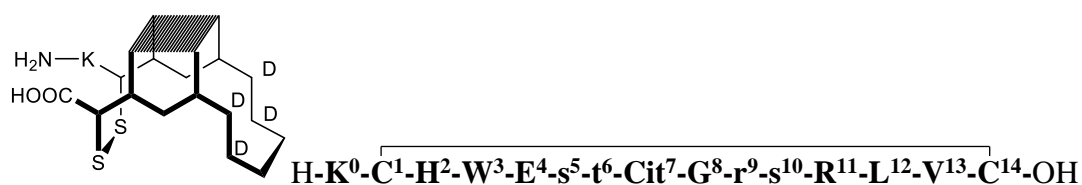


HPLC: $t_R = 6.13 \text{ min}$



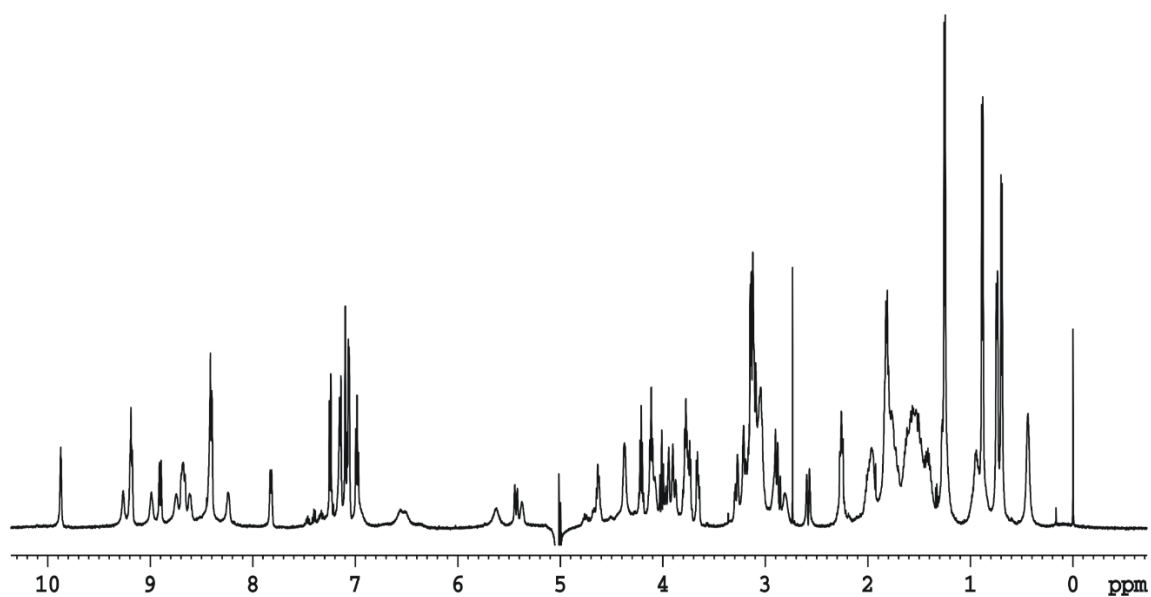
HR-MS (ESI⁺): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_{22}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9418.

Peptid 14

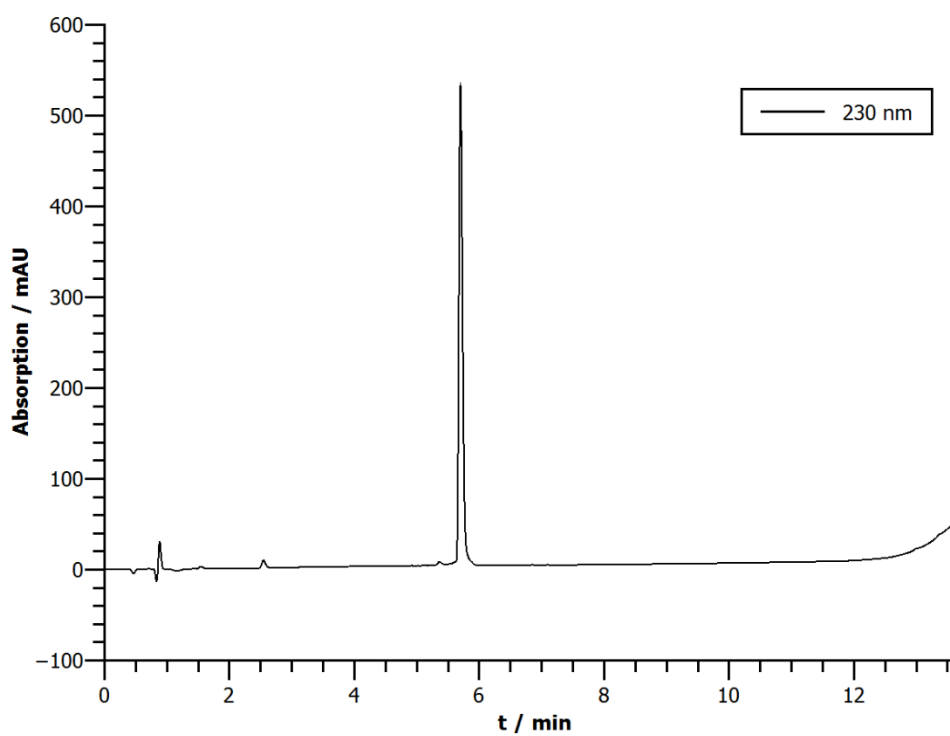


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys⁰	4.00	1.90	1.45	δ: 1.74, ε: 3.03	-
Cys¹	5.41	3.13, 2.60	-	-	n/a
His²	4.92	3.24, 3.18	-	aromatisch: δ ² : 7.04, ε ¹ : 8.24	9.10
Trp³	4.77	3.08	-	aromatisch: 2: 7.07, 1(NH): 9.83, 4: 7.24, 7: 7.18, 5: 6.98, 6: 7.08	8.97
Glu⁴	4.61	2.01, 1.83	2.24	-	8.76
ser⁵	5.13	3.78	-	-	8.57
thr⁶	4.62	4.22	1.23	-	8.59
Cit⁷	4.10	1.81	1.61, 1.56	δ: 3.14 ε(NH): 6.37	8.38
Gly⁸	3.95, 3.88	-	-	-	n/a
arg⁹	4.63	1.76	1.47	δ: 2.86, 2.77 ε(NH): n/a	7.76
ser¹⁰	5.36	3.76, 3.68	-	-	8.45
Arg¹¹	4.42	1.74, 1.61	1.41, 1.27	δ: 3.06, ε(NH): n/a	8.26
Leu¹²	4.08	1.46, 0.92	1.17	δ: 0.71, 0.38	8.26
Val¹³	4.01	1.45	0.88, 0.69	-	8.87
Cys¹⁴	4.75	3.10, 2.86	-	-	8.22



HPLC: $t_R = 5.70$ min

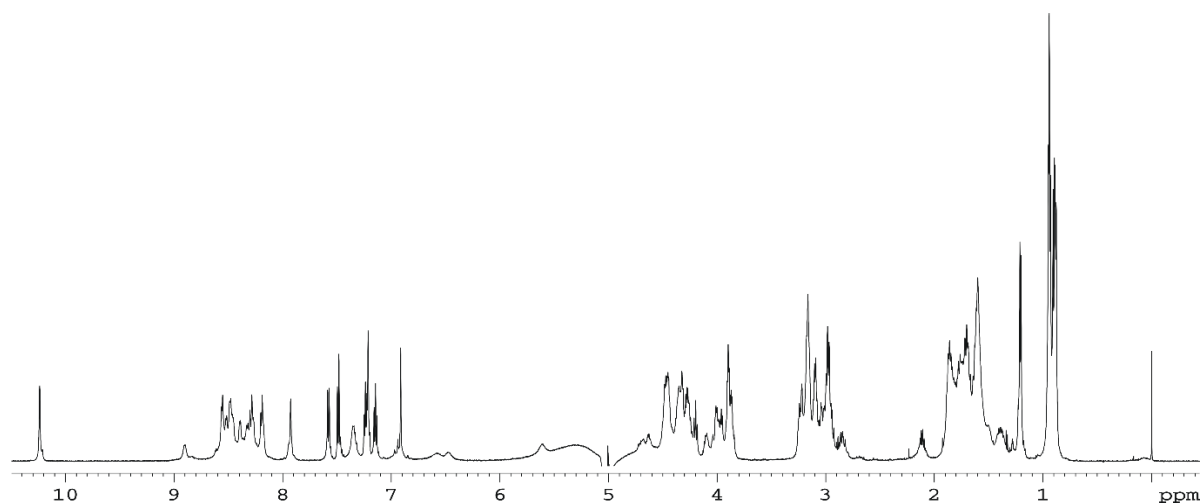


HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{121}N_{27}O_{22}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9377.

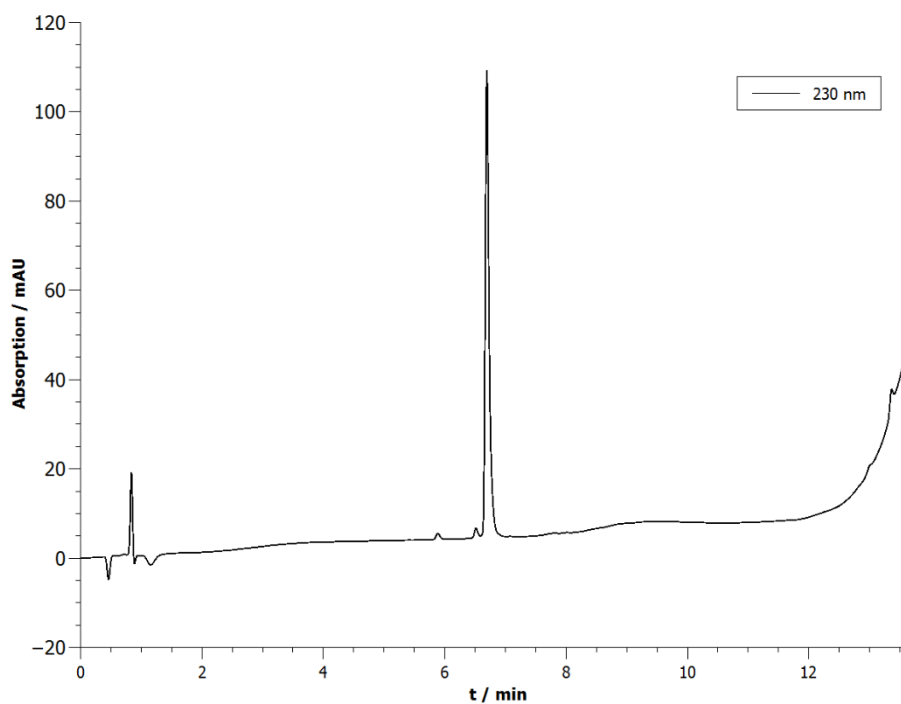
Peptid 15

H-K⁰-C¹-H²-w³-E⁴-S⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-I¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

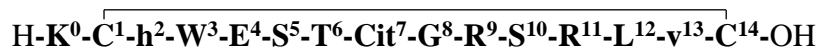


HPLC: $t_R = 6.69$ min

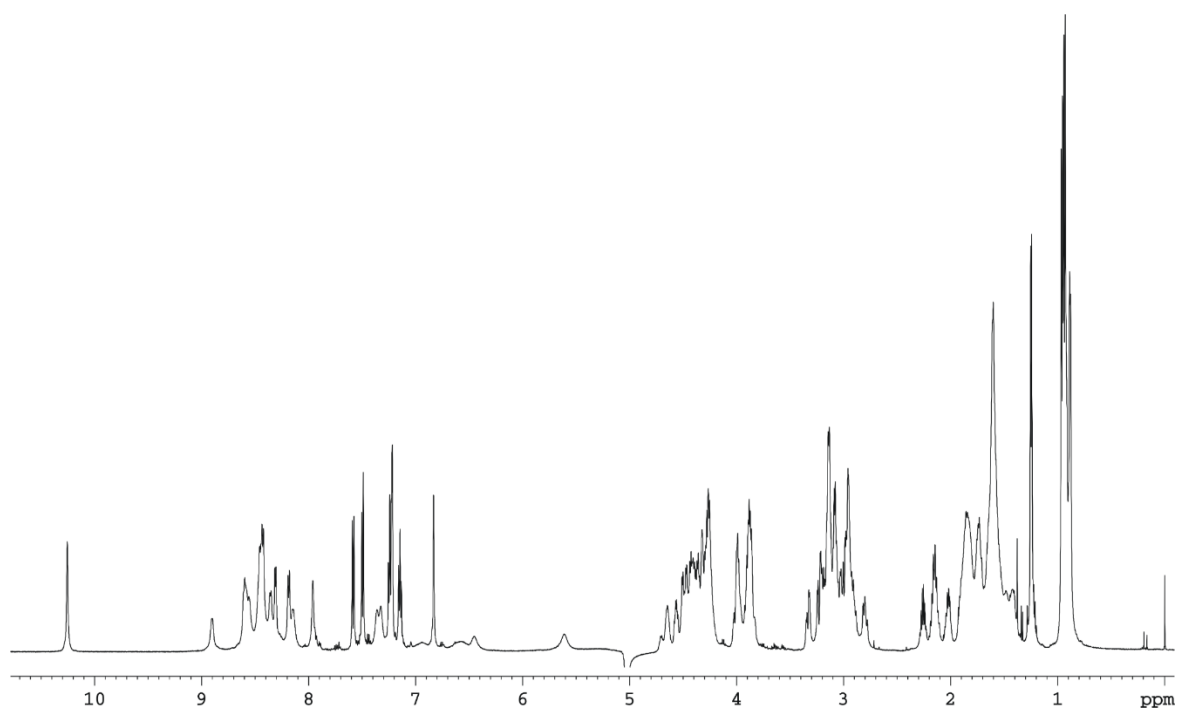


HR-MS (ESI⁺): für [C₇₅H₁₂₁N₂₇O₂₂S₂+2H]²⁺, ber.: 908.9383, gef.: 908.9415.

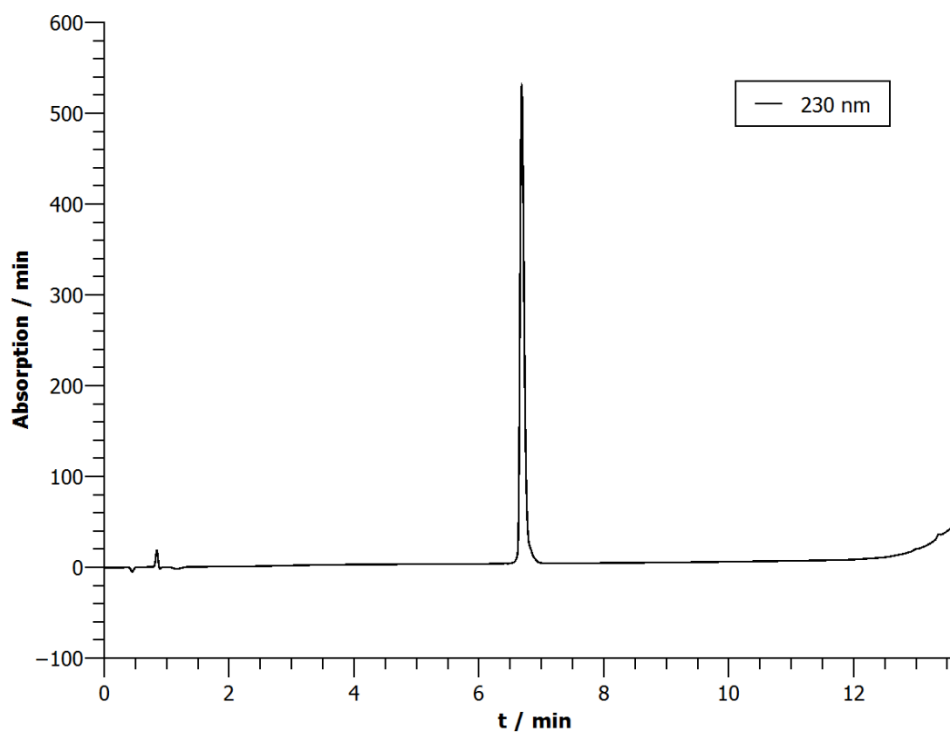
Peptid 16



$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

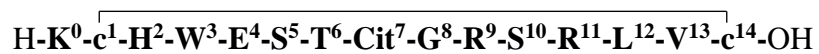
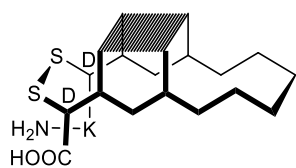


HPLC: $t_R = 6.68 \text{ min}$

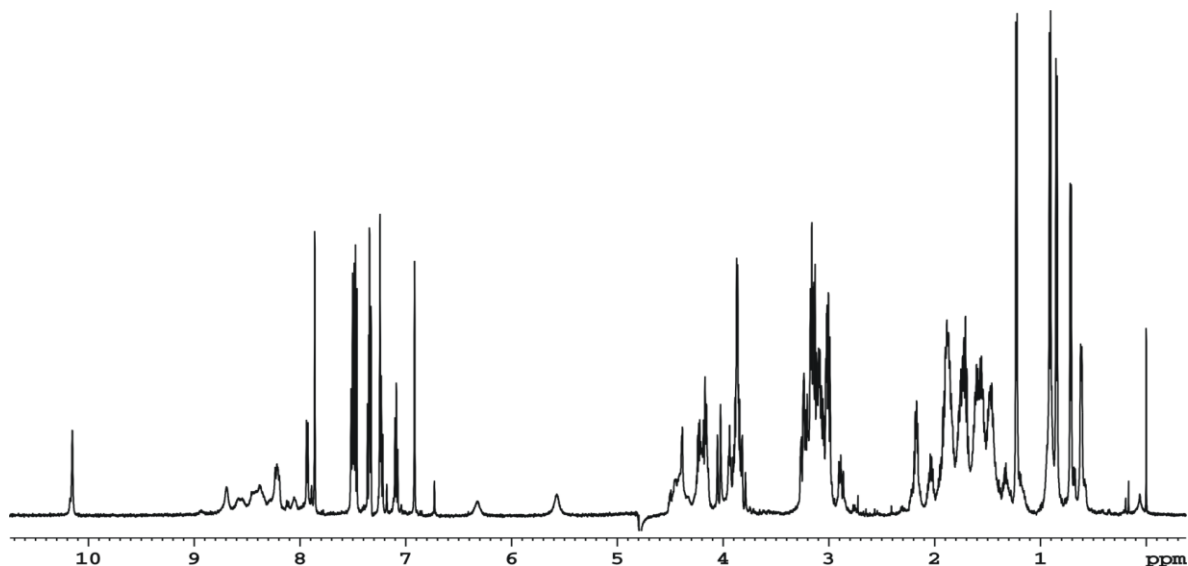


HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_{22}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9389.

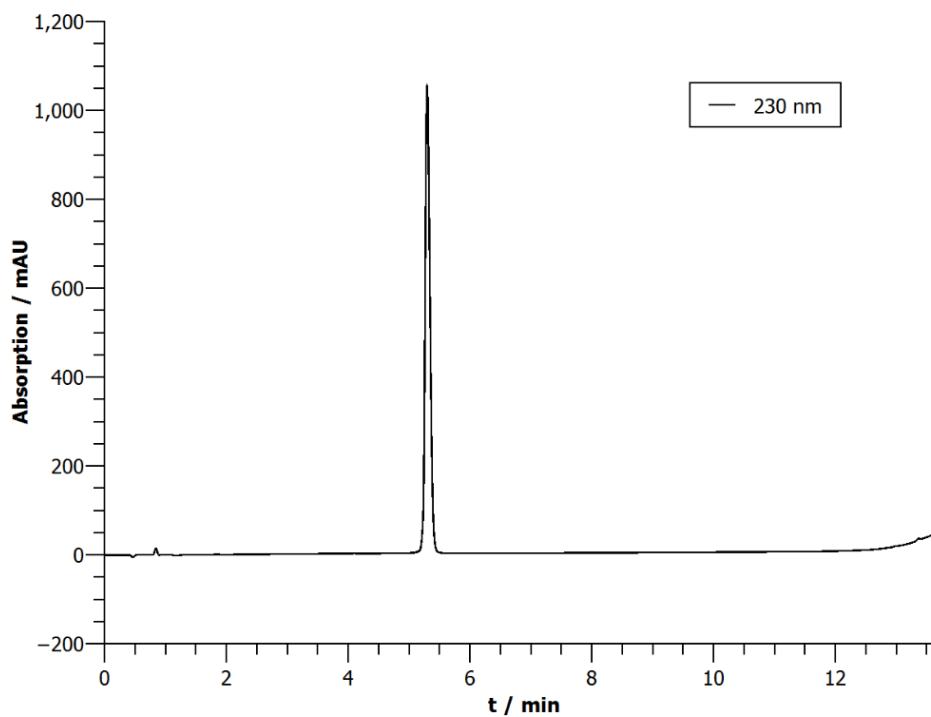
Peptid 17



¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

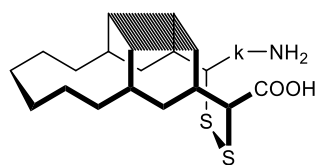


HPLC: $t_R = 5.29$ min



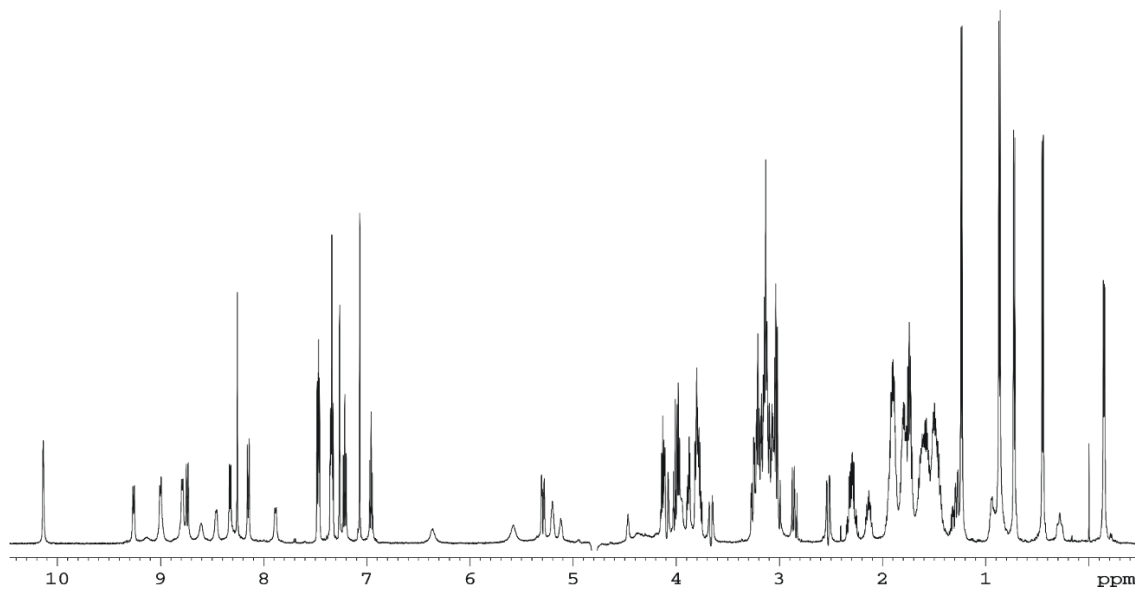
HR-MS (ESI⁺): für [C₇₅H₁₂₁N₂₇O₂₂S₂+2H]²⁺, ber.: 908.9383, gef.: 908.9382.

Peptid 18

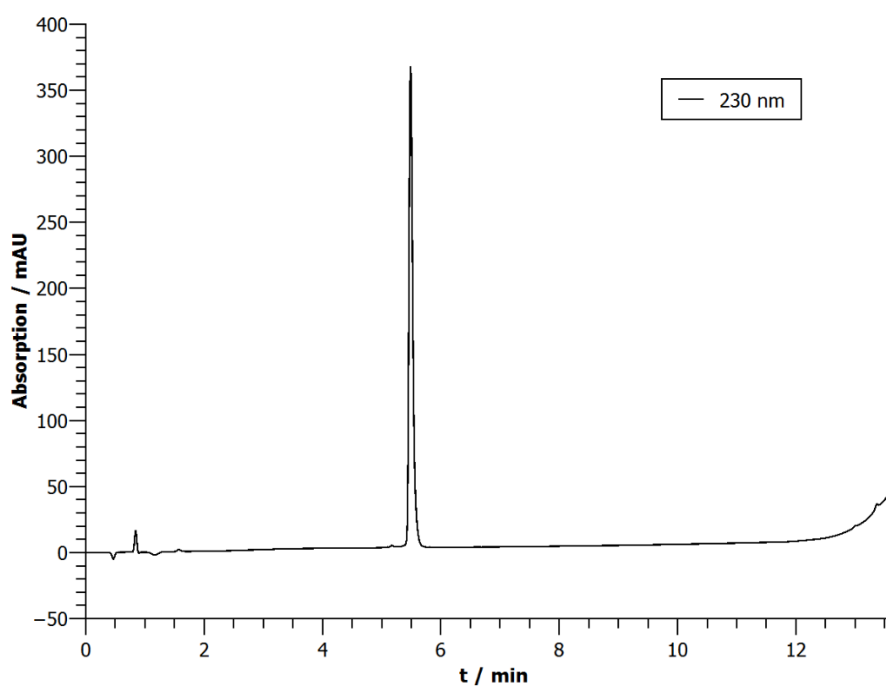


H-k⁰-c¹-h²-w³-e⁴-s⁵-t⁶-cit⁷-G⁸-r⁹-s¹⁰-r¹¹-l¹²-v¹³-c¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

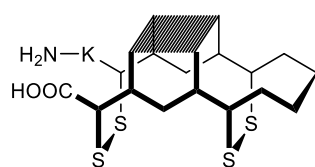


HPLC: $t_R = 5.48$ min



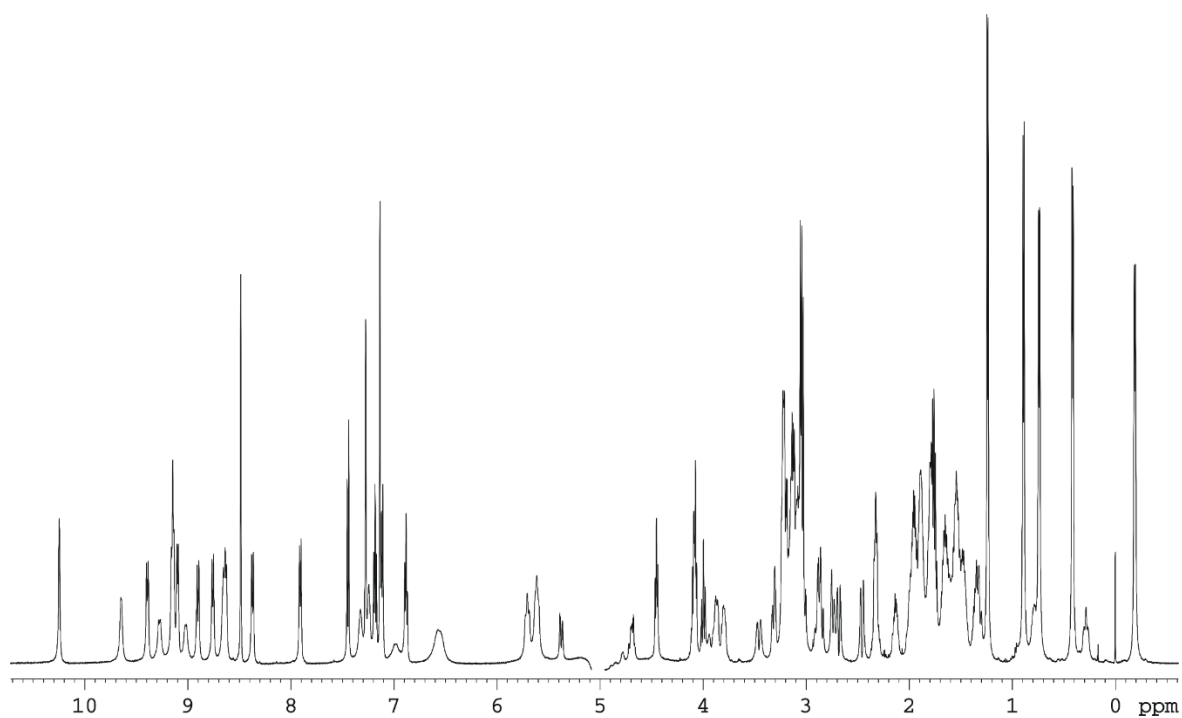
HR-MS (ESI⁺): für [C₇₅H₁₂₁N₂₇O₂₂S₂+2H]²⁺, ber.: 908.9383, gef.: 908.9379.

Peptid 19

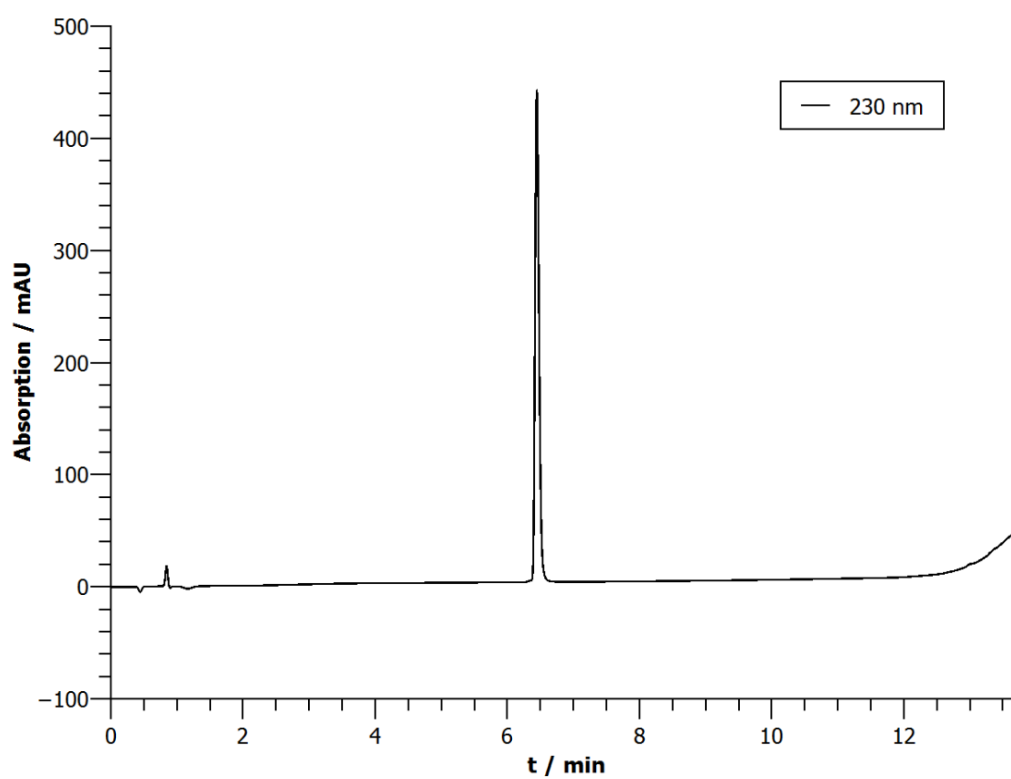

 H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-C¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.09	1.95	1.50	δ: 1.75, ε: 3.03	-
Cys ¹	5.46	3.16, 2.62	-	-	n/a
His ²	4.89	3.31, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 7.14, ε ¹ : 8.49	9.10
Trp ³	4.94	3.10	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.25, 4: 7.12, 7: 7.45, 5: 6.93, 6: 7.18	9.13
Glu ⁴	4.85	2.13, 1.88	2.32	-	9.38
Cys ⁵	5.61	3.09, 2.68	-	-	9.28
Thr ⁶	4.45	4.09	1.24	-	8.76
Cit ⁷	3.87	2.00, 1.81	1.59, 1.54	δ: 3.19, 3.13 ε(NH): 6.55	9.65
Gly ⁸	3.93, 3.46	-	-	-	8.65
Arg ⁹	4.68	1.88	1.65, 1.54	δ: 3.22 ε(NH): 7.33	7.91
Cys ¹⁰	5.70	2.90, 2.73	-	-	9.01
Arg ¹¹	4.78	1.79, 1.67	1.46	δ: 3.06, 2.89, ε(NH): 7.25	9.15
Leu ¹²	4.51	1.31, 0.30	0.78	δ: 0.43, -0.19	8.63
Val ¹³	4.00	1.35	0.89, 0.73	-	9.03
Cys ¹⁴	4.70	3.07, 2.86	-	-	8.37

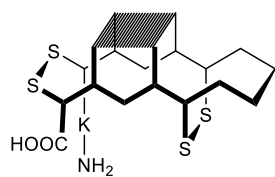


HPLC: $t_R = 6.44$ min



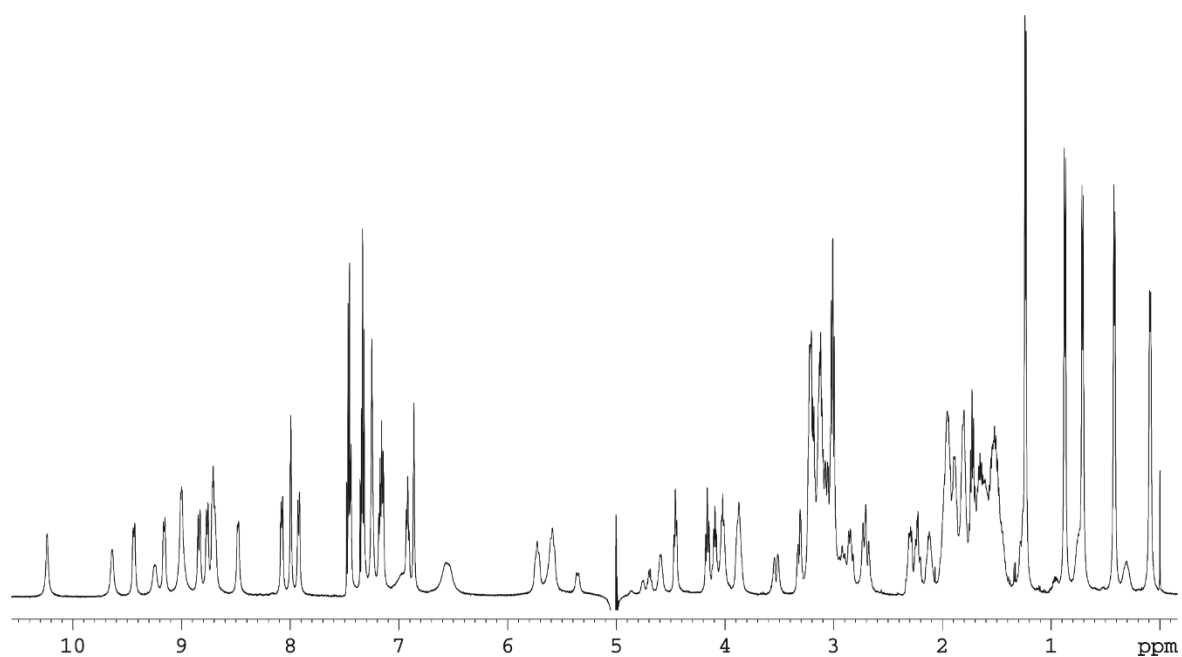
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{119}\text{N}_{27}\text{O}_{20}\text{S}_4 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 923.9077, gef.: 923.9073.

Peptid 20

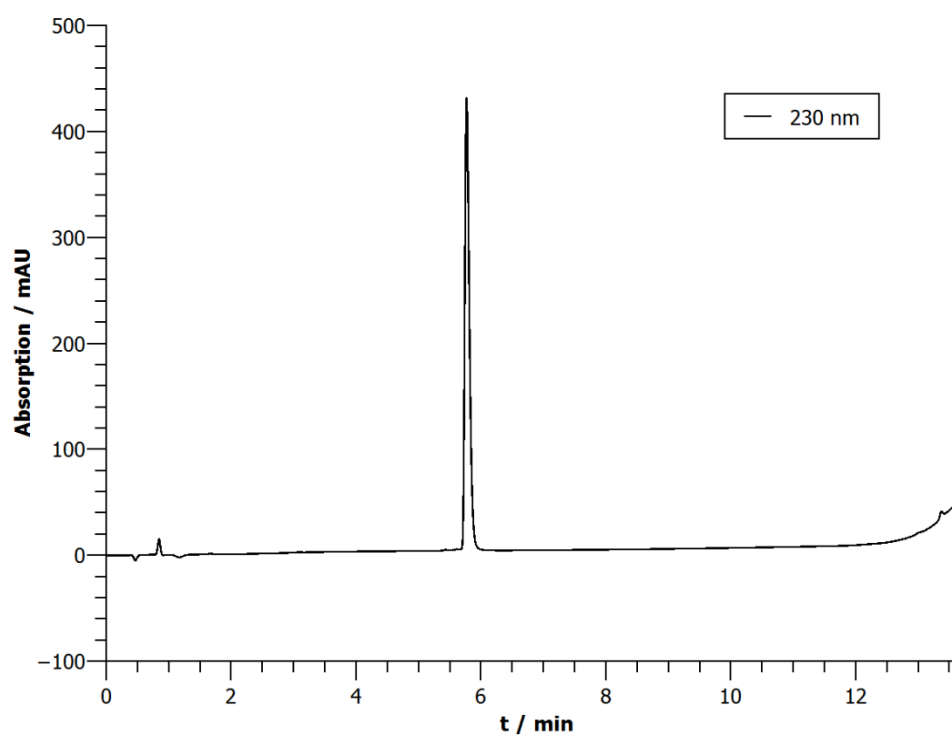


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys⁰	4.03	1.96	1.49	δ: 1.74, ε: 3.01	-
cys¹	5.36	3.21, 3.00	-	-	n/a
His²	4.87	3.32, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 6.87, ε ¹ : 7.99	8.71
Trp³	5.00	3.08	-	aromatisch: 2: 7.25, 1(NH): 10.24, 4: 7.15, 7: 7.45, 5: 6.92, 6: 7.33	9.00
Glu⁴	4.86	2.12, 1.96	2.31, 2.24		9.44
Cys⁵	5.59	3.08, 2.71	-	-	9.24
Thr⁶	4.45	4.08	1.24	-	8.76
Cit⁷	3.89	1.99, 1.81	1.57	δ: 3.16, ε(NH): 6.52	9.64
Gly⁸	4.02, 3.52	-	-	-	8.69
Arg⁹	4.70	1.89	1.65, 1.54	δ: 3.22, ε(NH): 7.32	7.92
Cys¹⁰	5.75	2.93, 2.72	-	-	9.00
Arg¹¹	4.76	1.81	1.68, 1.45	δ: 3.14 ε(NH): 7.25	9.16
Leu¹²	3.86	1.27, 0.31	0.76	δ: 0.42, 0.09	8.48
Val¹³	4.16	1.61	0.87, 0.71	-	8.84
cys¹⁴	4.61	3.04, 2.84	-	-	8.27

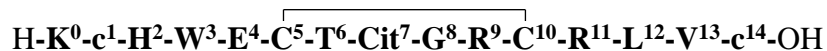
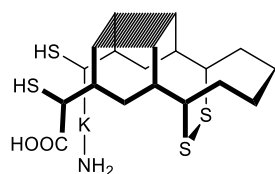


HPLC: $t_R = 5.77$ min



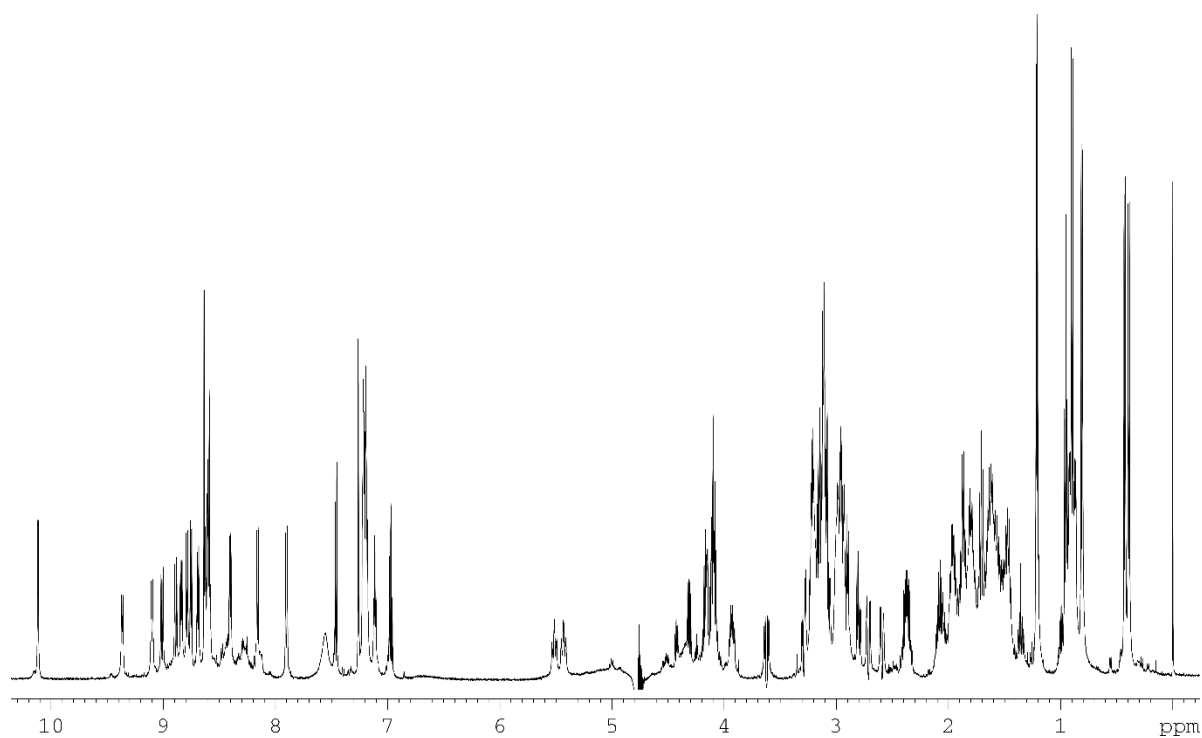
HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{119}N_{27}O_{20}S_4 + 2H]^{2+}$, ber.: 923.9077, gef.: 923.9083.

Peptid 20md

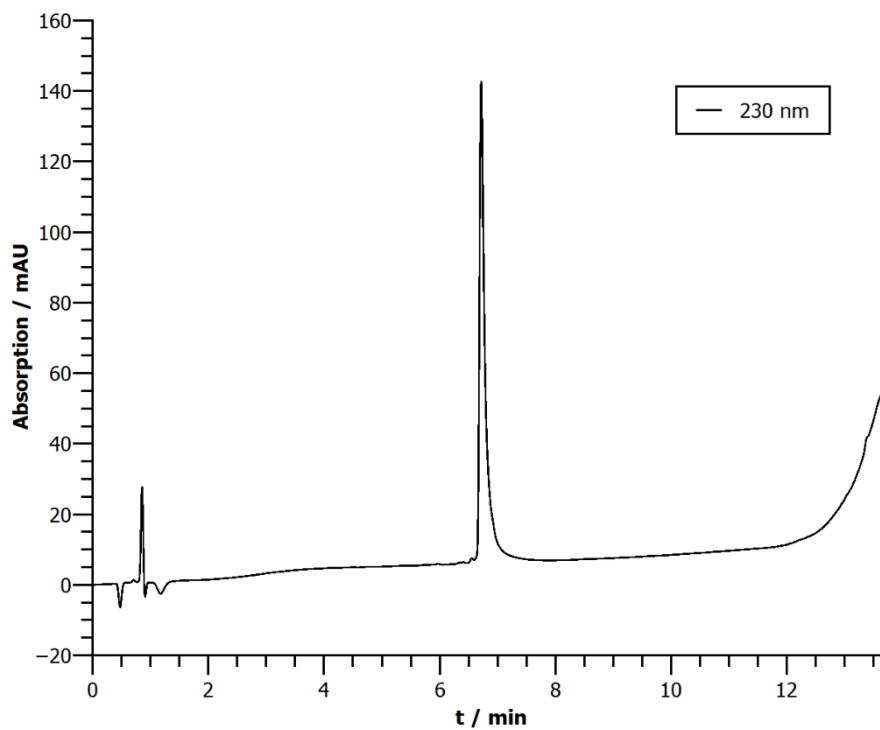


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys⁰	4.10	1.96	1.47	δ: 1.70, ε: 3.00	-
cys¹	4.53	2.91, 2.80	-	-	8.75
His²	4.92	3.29, 3.07	-	aromatisch: δ ² : 7.26, ε ¹ : 8.64	8.79
Trp³	5.00	3.11	-	aromatisch: 2: 7.21, 1(NH): 10.24, 4: 7.22, 7: 7.45, 5: 6.97, 6: 7.18	8.69
Glu⁴	4.72	2.06, 1.89	2.37		9.10
Cys⁵	5.44	3.08, 2.71	-	-	9.01
Thr⁶	4.42	4.08	1.22	-	8.60
Cit⁷	3.93	1.98, 1.80	1.55	δ: 3.12, ε(NH): n/a	9.37
Gly⁸	4.13, 3.62	-	-	-	8.59
Arg⁹	4.64	1.87	1.65, 1.56	δ: 3.22, ε(NH): 7.18	7.90
Cys¹⁰	5.51	2.92, 2.59	-	-	8.89
Arg¹¹	4.65	1.80	1.61, 1.46	δ: 3.13 ε(NH): 7.11	8.84
Leu¹²	4.16	1.36, 0.90	0.99	δ: 0.43, 0.39	8.41
Val¹³	4.16	2.09	0.90, 0.81	-	8.62
cys¹⁴	4.50	2.94	-	-	8.16

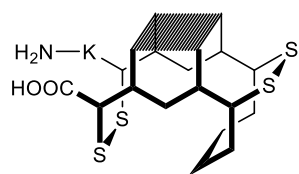


HPLC: $t_R = 6.72 \text{ min}$



HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_{20}\text{S}_4+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 924.9155, gef.: 924.9177.

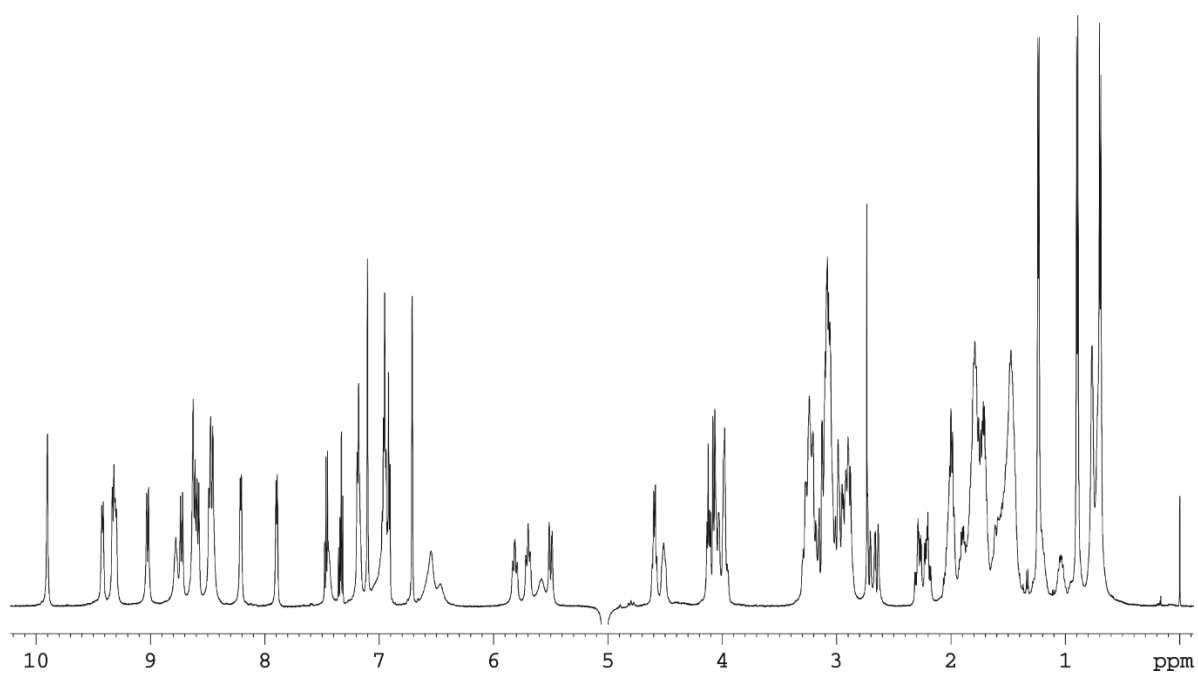
Peptid 21



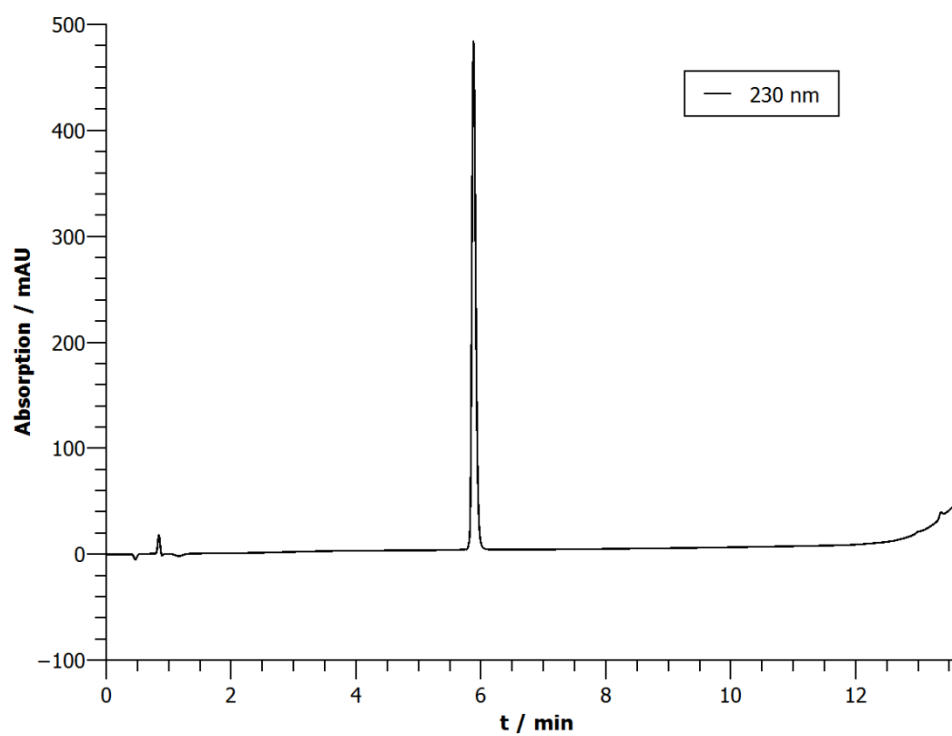
H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-c⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-c¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys⁰	4.09	1.96	1.51	δ: 1.76, ε: 3.05	-
Cys¹	5.46	3.16, 2.62	-	-	n/a
His²	5.03	3.25	-	aromatisch: δ ² : 7.10, ε ¹ : 8.44	9.33
Trp³	4.90	3.08	-	aromatisch: 2: 6.71, 1(NH): 9.91, 4: 7.19, 7: 6.91, 5: 6.94, 6: 6.96	9.31
Glu⁴	4.54	1.89, 1.71	2.28, 2.20	-	8.58
cys⁵	5.70	2.96	-	-	8.62
Thr⁶	4.89	4.60	1.22	-	9.42
Cit⁷	4.05	1.79	1.51, 1.46	δ: 3.08 ε(NH): 6.46	8.63
Gly⁸	4.06, 3.98	-	-	-	8.78
Arg⁹	4.87	2.01	1.82, 1.70	δ: 3.22 ε(NH): 7.29	7.89
cys¹⁰	5.79	2.90, 2.71	-	-	8.73
Arg¹¹	3.98	1.60, 1.46	1.20, 1.03	δ: 3.06, 2.89, ε(NH): 7.17	8.21
Leu¹²	4.51	1.76	1.46	δ: 0.77, 0.70	8.49
Val¹³	4.06	1.45	0.90, 0.70	-	9.03
Cys¹⁴	4.78	3.13, 2.91	-	-	8.46

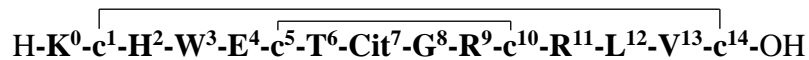
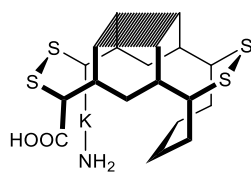


HPLC: $t_R = 5.88$ min



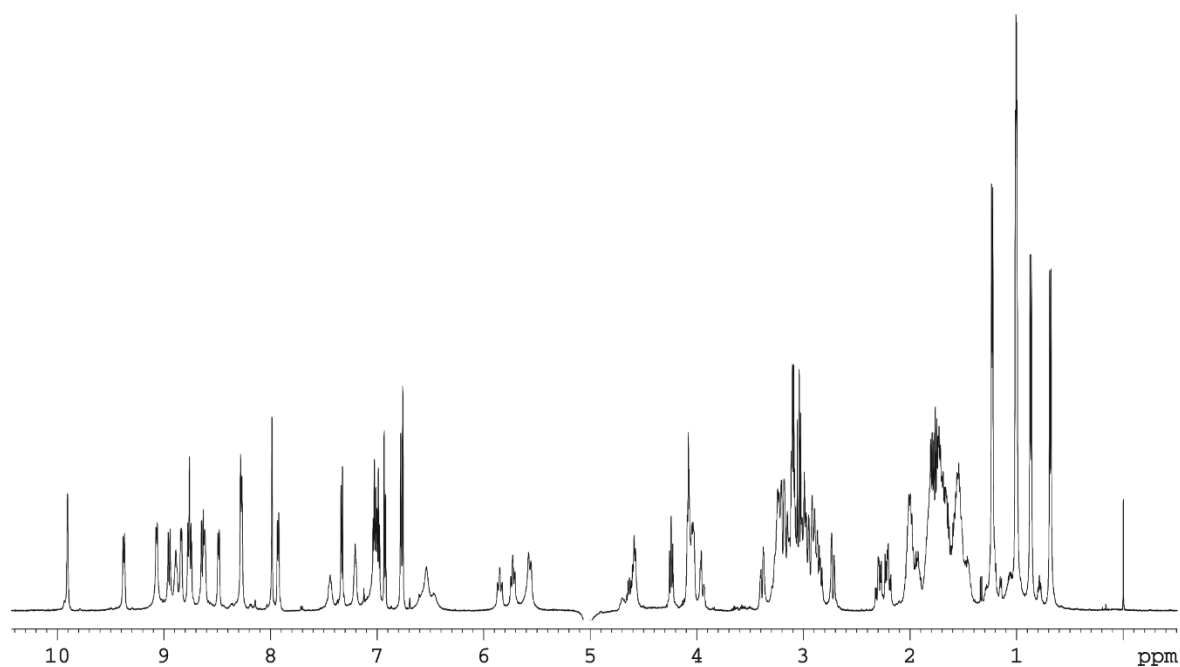
HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{119}N_{27}O_{20}S_4+2H]^{2+}$, ber.: 923.9077, gef.: 923.9082.

Peptid 22

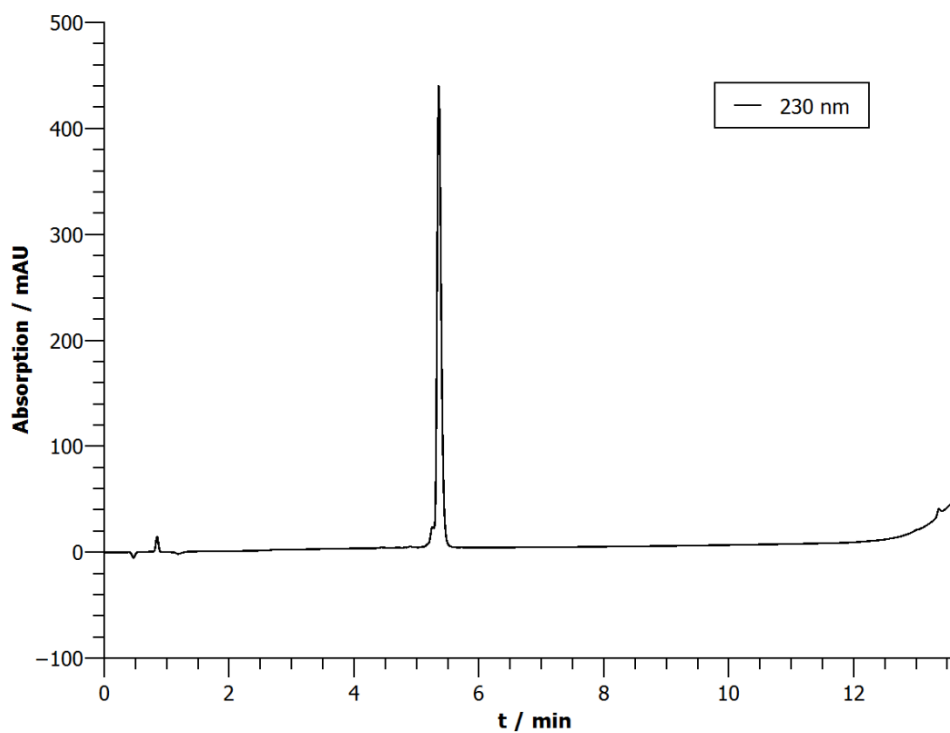


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

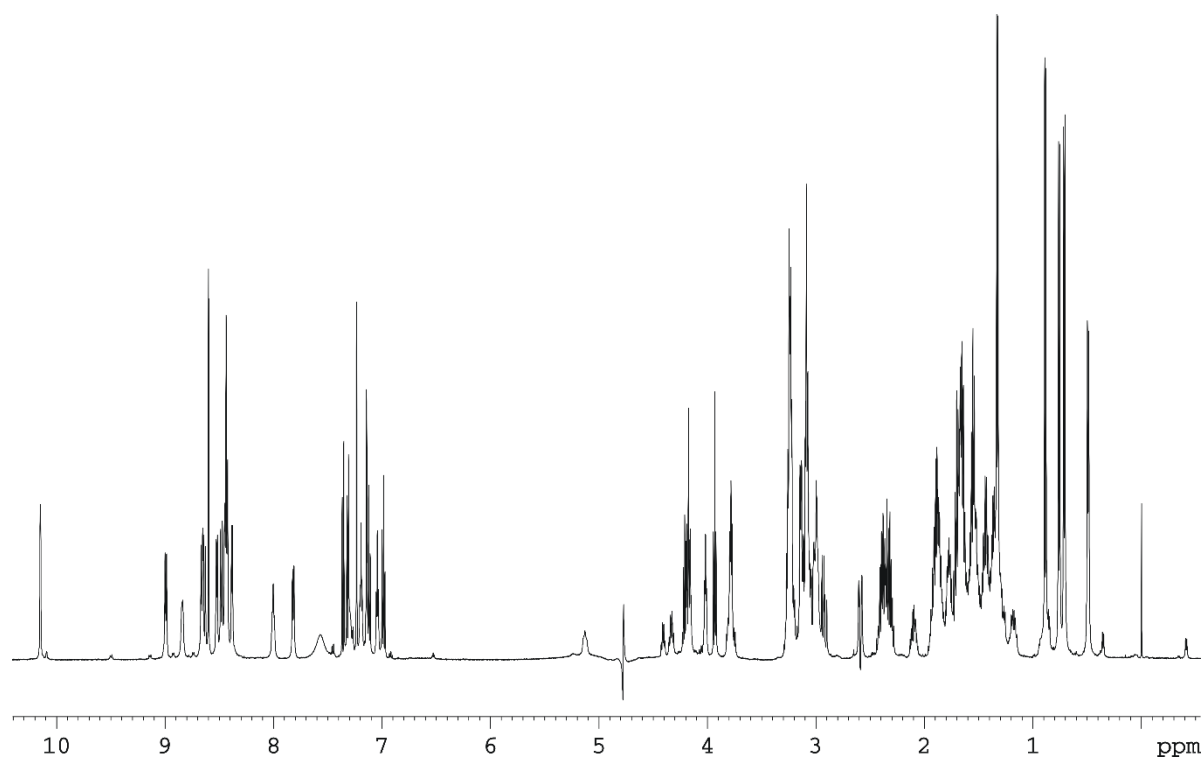
Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys⁰	4.07	2.00	1.53	δ: 1.75, ε: 3.05	-
cys¹	5.57	3.26, 2.98	-	-	n/a
His²	4.90	3.39, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 6.78, ε ¹ : 7.99	8.84
Trp³	4.96	3.17		aromatisch: 2: 6.76, 1(NH): 9.91, 4: 7.33, 7: 6.93, 5: 7.03, 6: 6.99	9.07
Glu⁴	4.64	1.94, 1.81	2.30, 2.21		8.76
cys⁵	5.73	2.97	-	-	8.64
Thr⁶	4.90	4.56	1.22	-	9.37
Cit⁷	4.08	1.80	1.55, 1.46	δ: 3.09, ε(NH): 6.46	8.61
Gly⁸	3.94, 3.06	-	-	-	8.89
Arg⁹	4.90	2.03, 1.85	1.71	δ: 3.22, ε(NH): 7.44	7.92
cys¹⁰	5.85	2.91, 2.73	-	-	8.75
Arg¹¹	4.03	1.67, 1.52	1.23, 1.06	δ: 3.10, 2.89 ε(NH): 7.21	8.27
Leu¹²	4.60	1.70	1.70	δ: 1.00	8.49
Val¹³	4.23	1.58	0.85, 0.64	-	8.95
cys¹⁴	4.69	3.13, 2.82	-	-	8.27



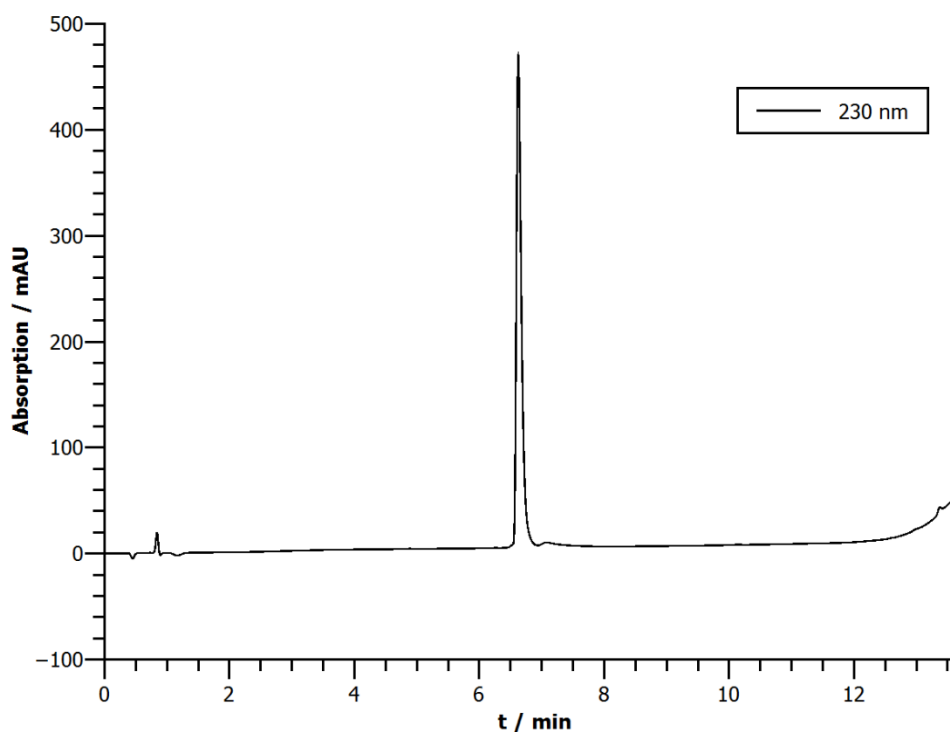
HPLC: $t_R = 5.35 \text{ min}$



HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{119}\text{N}_{27}\text{O}_{20}\text{S}_4 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 923.9077, gef.: 923.9079.

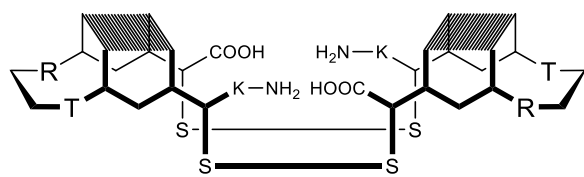


HPLC: $t_R = 6.62$ min



HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{122}N_{26}O_{19}S_2+3H]^{3+}$, ber.: 585.9680, gef.: 585.9673.

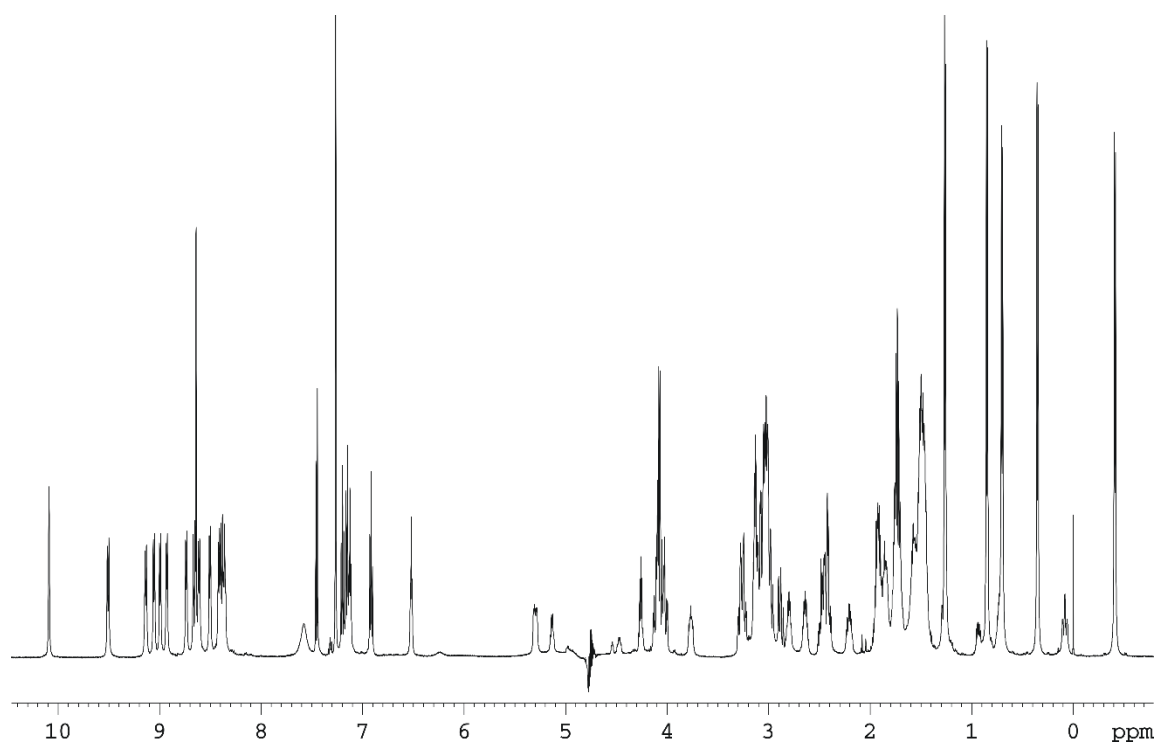
Peptid 23d



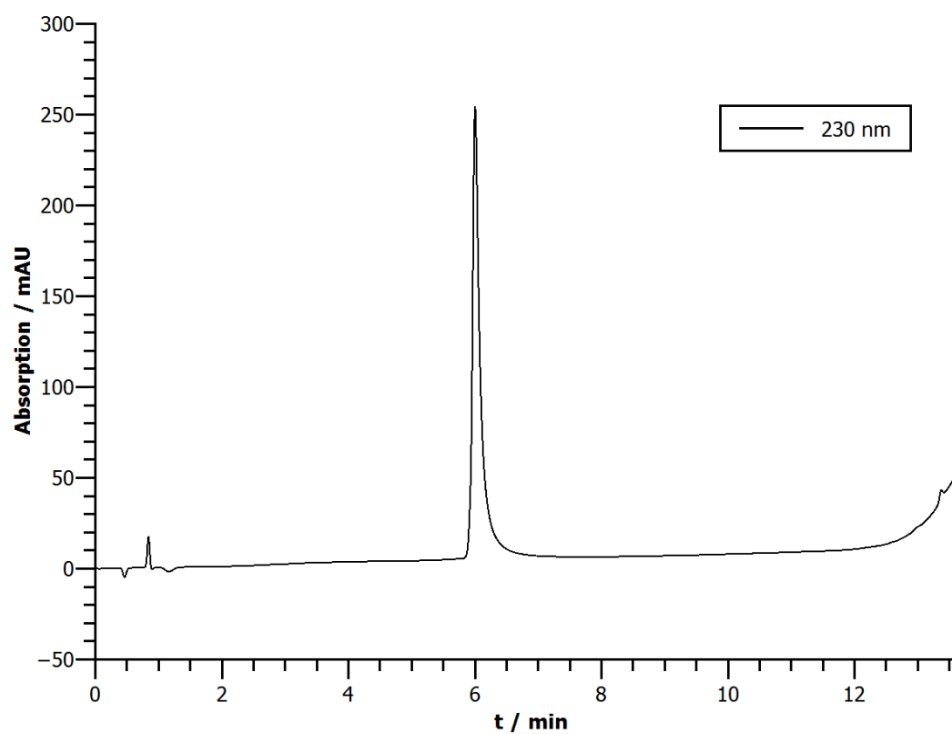
(H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-T⁵-Cit⁶-G⁷-R⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH) (H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-T⁵-Cit⁶-G⁷-R⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH)

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys⁰	4.07	1.92	1.47	δ: 1.73, ε: 3.02 ζ(NH ₃ ⁺): 7.57	-
Cys¹	5.29	2.97, 2.43		-	9.00
His²	4.83	3.26		aromatisch: δ ² : 7.26, ε ¹ : 8.64	9.06
Trp³	4.96	3.10, 2.99		aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.09, 4: 7.16, 7: 7.45, 5: 6.92, 6: 7.20	8.93
Glu⁴	4.93	2.20, 1.91	2.44	-	9.51
Thr⁵	4.54	4.25	1.24	-	8.74
Cit⁶	4.17	1.85, 1.56	1.45	δ: 3.05 ε(NH): n/a	8.42
Gly⁷	4.11, 4.07	-	-	-	8.36
Arg⁸	5.10	1.85, 1.71	1.53	δ: 2.80, 2.63 ε(NH): 6.53	8.51
Arg⁹	4.89	1.75	1.50	δ: 3.13 ε(NH): 7.04	9.14
Leu¹⁰	3.75	1.23, 0.09	1.26	δ: 0.35, -0.41	8.61
Val¹¹	4.07	1.47	0.85, 0.70	-	8.66
Cys¹²	4.73	3.05, 2.86		-	8.39

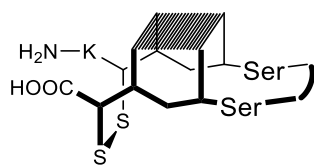


HPLC: $t_R = 6.00$ min



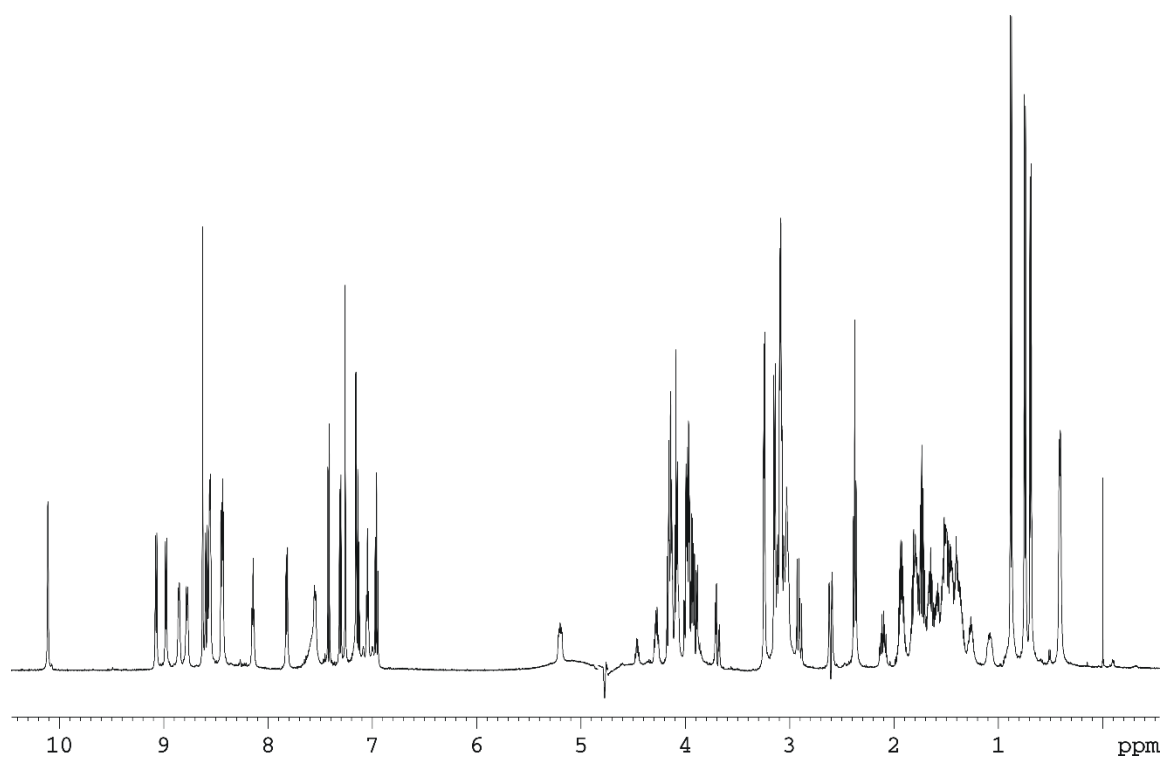
HR-MS (ESI+): für $[C_{138}H_{222}N_{50}O_{36}S_4+3H]^{3+}$, ber.: 1095.8735, gef.: 1095.8736.

Peptid 24m

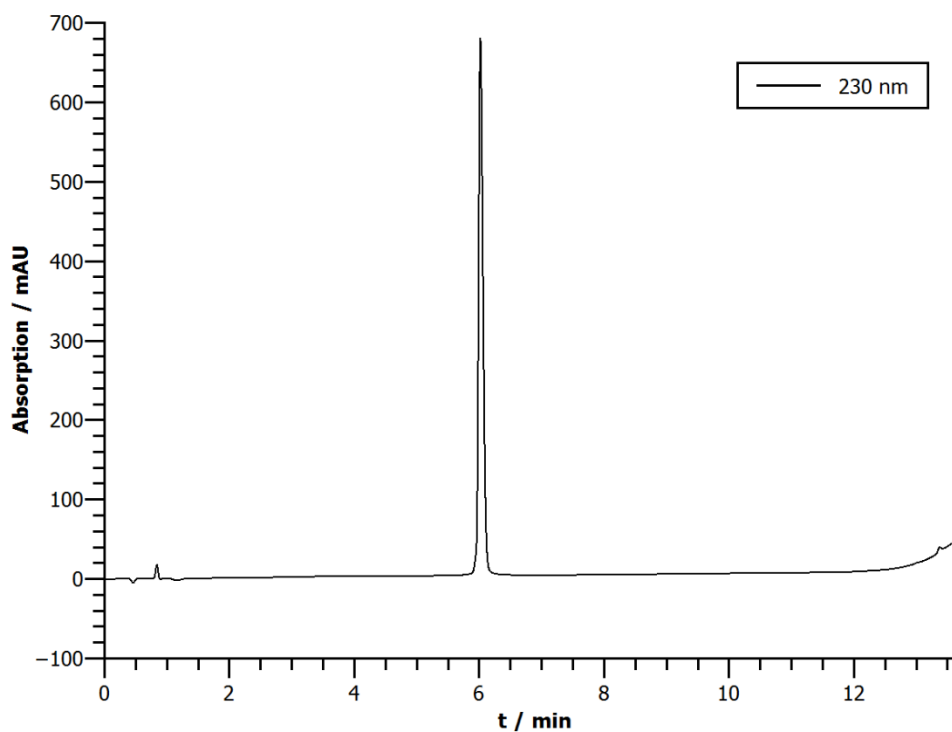


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1.

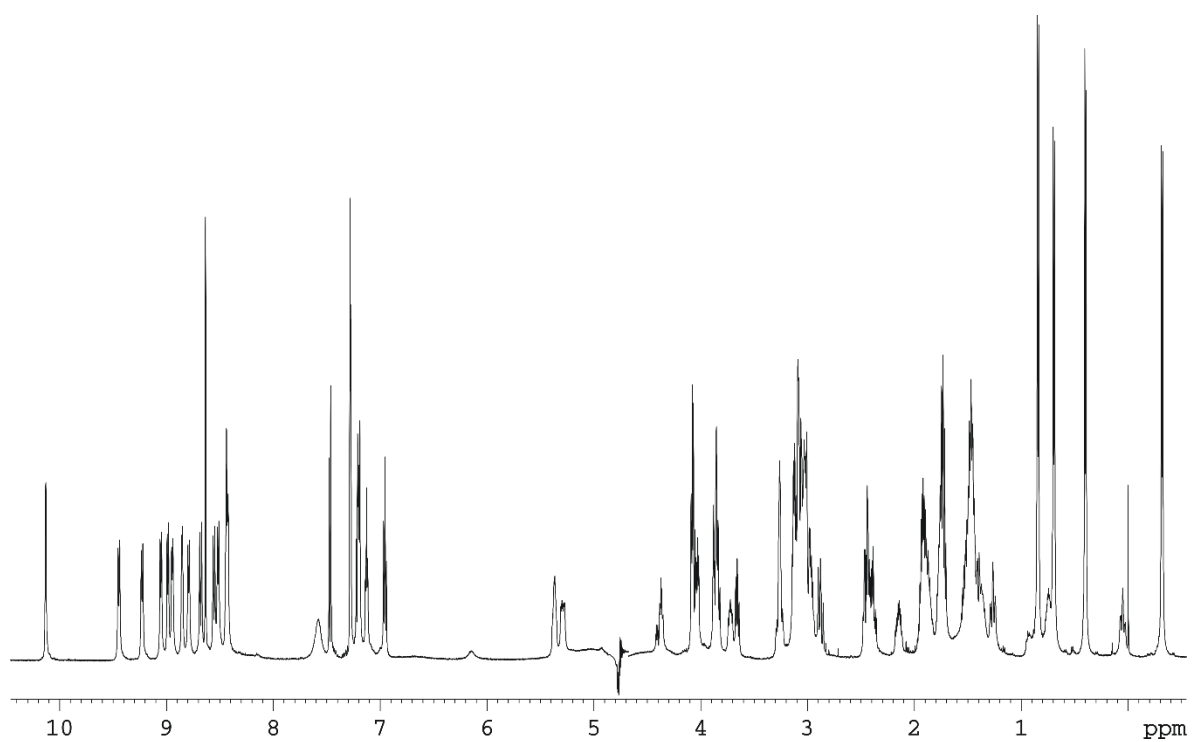
Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.09	1.94	1.47	δ: 1.73, ε: 3.02 ζ(NH ₃ ⁺): 7.62	-
Cys ¹	5.20	3.06, 2.61	-	-	8.98
His ²	4.89	3.24	-	aromatisch: δ ² : 7.27, ε ¹ : 8.63	9.07
Trp ³	4.79	3.12	-	aromatisch: 2: 7.16, 1(NH): 10.11, 4: 7.31, 7: 7.43, 5: 6.97, 6: 7.15	8.86
Glu ⁴	4.63	2.11, 1.81	2.37	-	8.78
Ser ⁵	4.14	3.94	-	-	8.56
Cit ⁶	4.14	1.79	1.49	δ: 3.09 ε(NH): n/a	8.56
Gly ⁷	3.91, 3.70	-	-	-	8.15
Ser ⁸	4.09	3.98	-	-	7.82
Arg ⁹	4.47	1.67, 1.60	1.38	δ: 3.08 ε(NH): 7.05	7.55
Leu ¹⁰	4.29	1.53, 1.09	1.27	δ: 0.69, 0.41	8.43
Val ¹¹	4.17	1.65	0.88, 0.74	-	8.59
Cys ¹²	4.73	3.11, 2.91	-	-	8.45



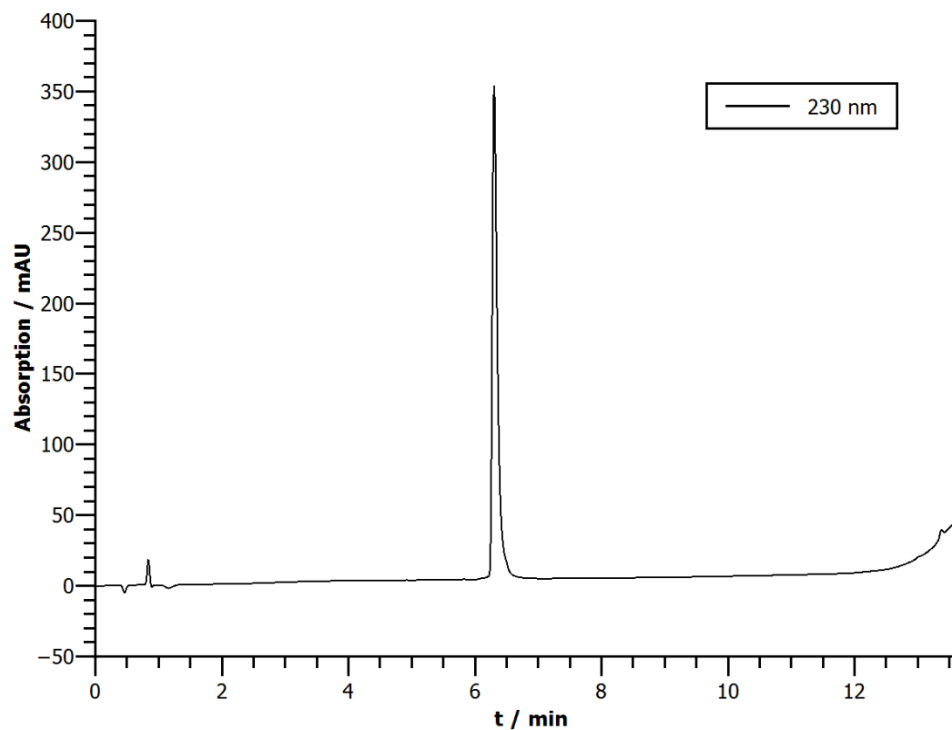
HPLC: $t_R = 6.02 \text{ min}$



HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{65}\text{H}_{104}\text{N}_{22}\text{O}_{19}\text{S}_2+3\text{H}]^{3+}$, ber.: 520.5784, gef.: 520.5788.

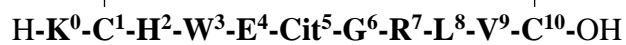
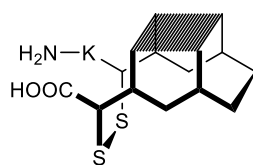


HPLC: $t_R = 6.30$ min



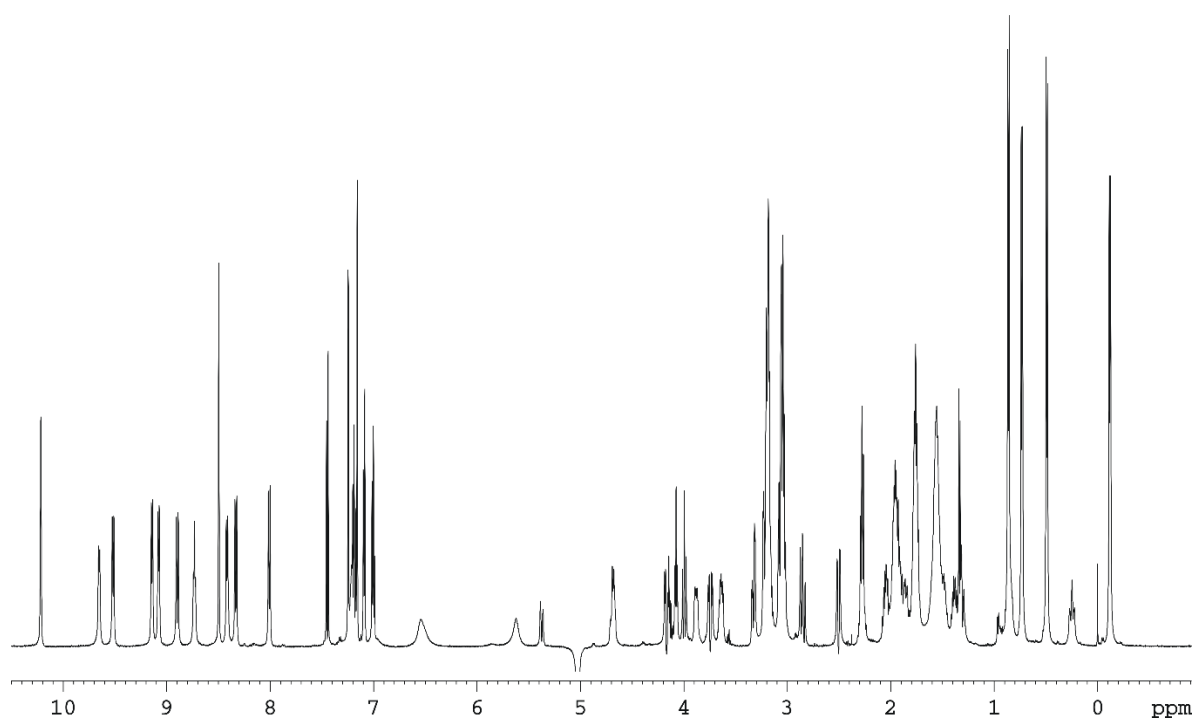
HR-MS (ESI+): für $[C_{130}H_{204}N_{44}O_{38}S_4+3H]^{3+}$, ber.: 1040.4837, gef.: 1040.4841.

Peptid 25

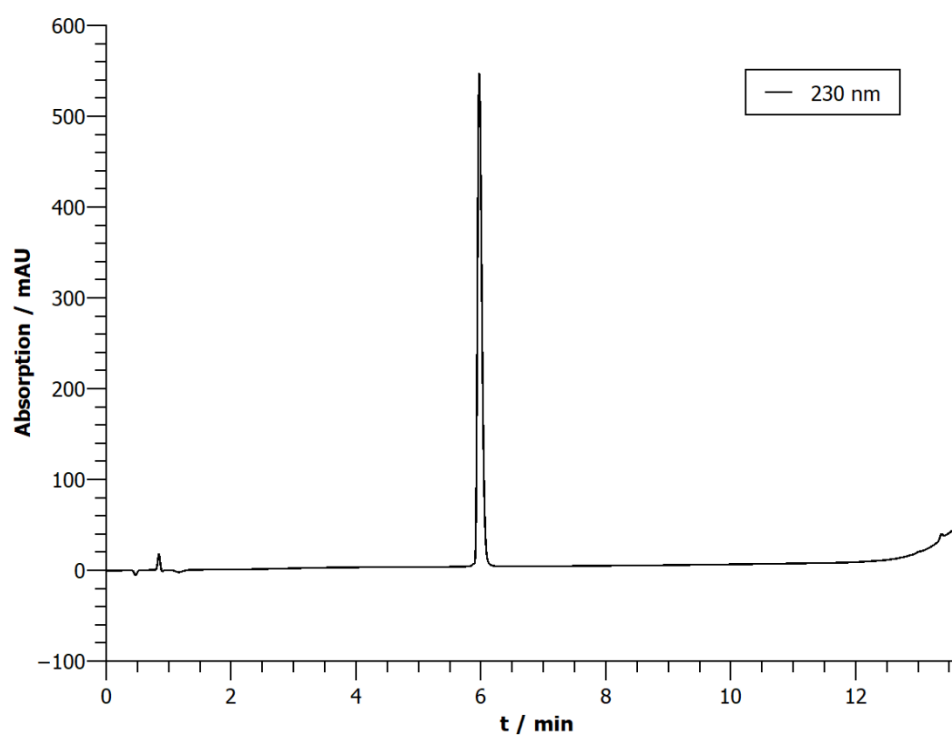


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.07	1.94	1.50	δ: 1.75, ε: 3.03	-
Cys ¹	5.38	3.04, 2.51	-	-	n/a
His ²	4.86	3.33, 3.21	-	aromatisch: δ ² : 7.16, ε ¹ : 8.50	9.14
Trp ³	4.93	3.19, 3.04	-	aromatisch: 2: 7.25, 1(NH): 10.23, 4: 7.09, 7: 7.45, 5: 7.00, 6: 7.19	9.07
Glu ⁴	4.67	2.03, 1.90	2.25	-	9.52
Cit ⁵	3.87	1.97, 1.84	1.57	δ: 3.18 ε(NH): 6.54	9.65
Gly ⁶	4.15, 3.74	-	-	-	8.73
Arg ⁷	4.69	1.75	1.53	δ: 3.18 ε(NH): 7.21	8.01
Leu ⁸	3.62	1.31, 0.24	0.83	δ: 0.49, -0.12	8.42
Val ⁹	3.99	1.38	0.87, 0.74	-	8.89
Cys ¹⁰	4.68	3.05, 2.84	-	-	8.33

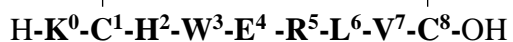
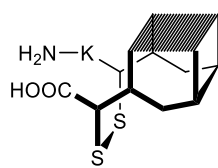


HPLC: $t_R = 5.97$ min



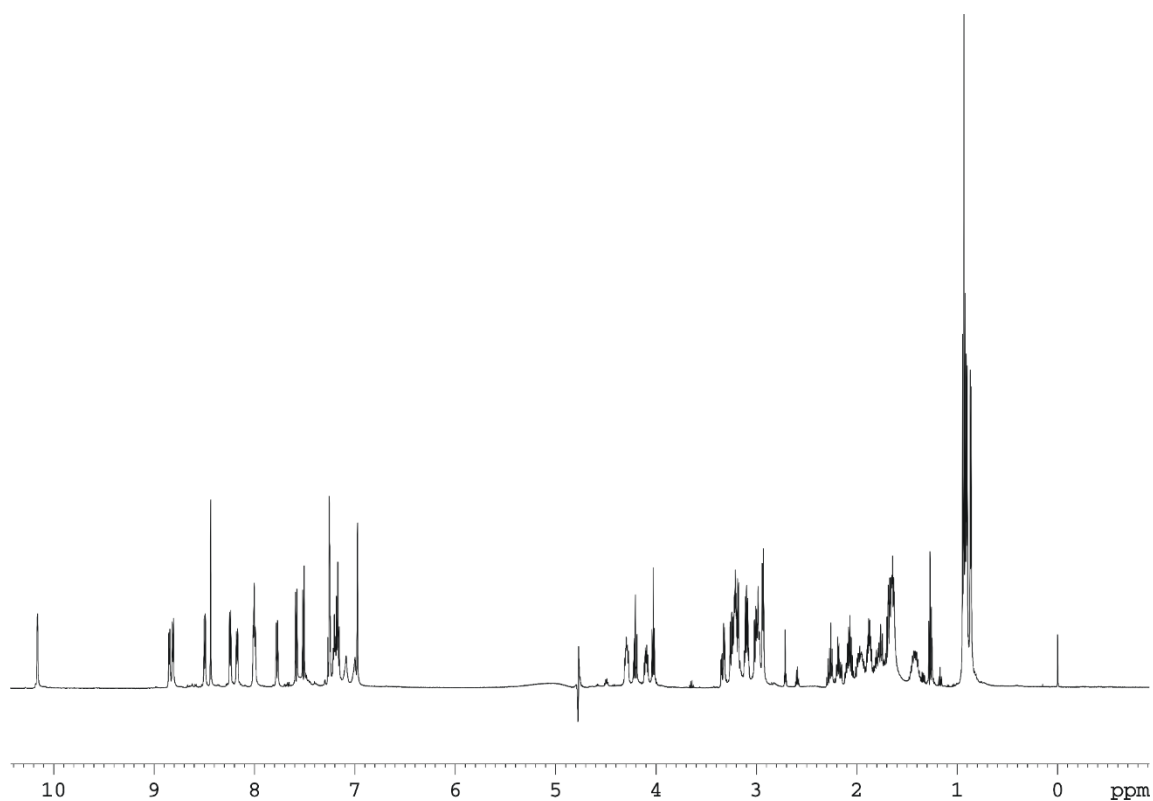
HR-MS (ESI+): für $[C_{59}H_{92}N_{20}O_{15}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 693.3319, gef.: 693.3319.

Peptid 26

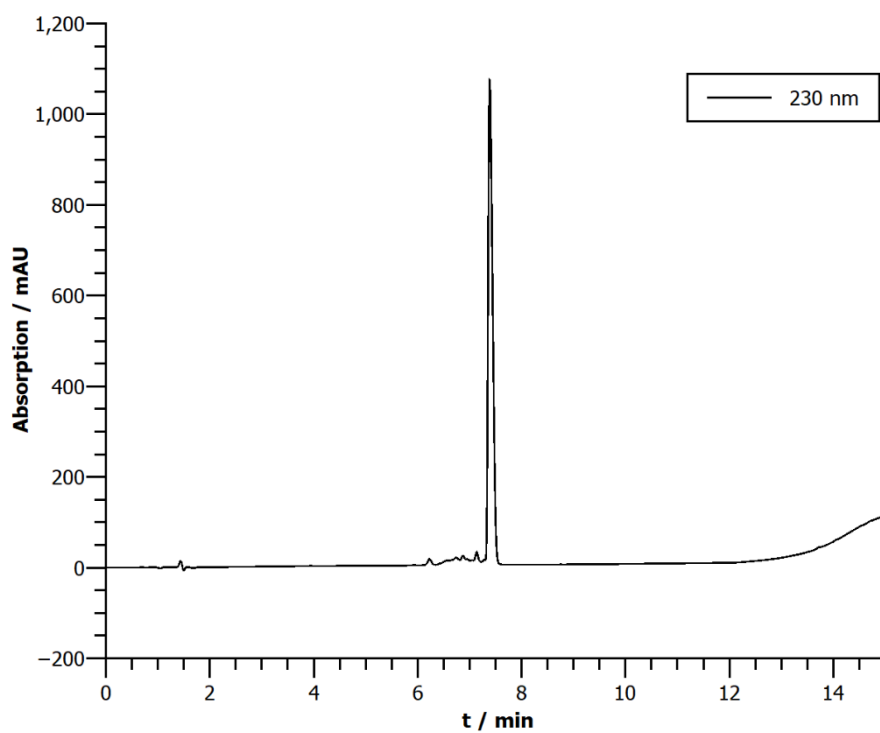


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.03	1.87	1.41	δ: 1.69, ε: 2.99	-
Cys ¹	4.64	3.11, 3.00	-	-	8.85
His ²	4.58	2.94	-	aromatisch: δ ² : 6.98, ε ¹ : 8.44	8.81
Trp ³	4.67	3.34, 3.24	-	aromatisch: 2: 7.26, 1(NH): 10.16, 4: 7.59, 7: 7.52, 5: 7.17, 6: 7.26	8.01
Glu ⁴	4.11	2.08, 1.98	2.27, 2.19	-	8.50
Arg ⁵	4.29	1.96, 1.79	1.65	δ: 3.21 ε(NH): 7.21	8.00
Leu ⁶	4.29	1.76, 1.64	1.64	δ: 0.91, 0.87	8.18
Val ⁷	4.21	2.06	0.94	-	7.78
Cys ⁸	4.49	3.21, 3.10	-	-	8.24



HPLC: $t_R = 7.39$ min (Säule: ACE 3 C18, 150 x 3.0 mm, Gradient: 15-30% B in 10 min
Flussrate: 0.60 mL/min)



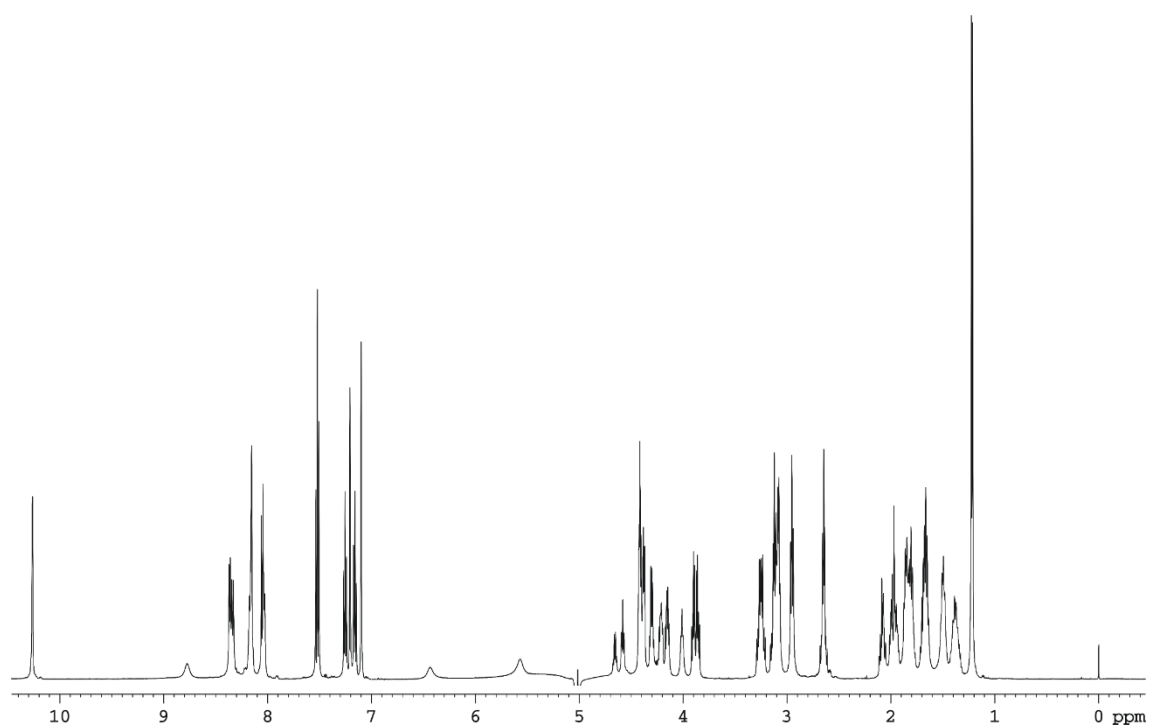
HR-MS (ESI+): für $[C_{51}H_{78}N_{16}O_{12}S_2+1H]^+$, ber.: 1171.5499, gef.: 1171.5501.

Peptid 27

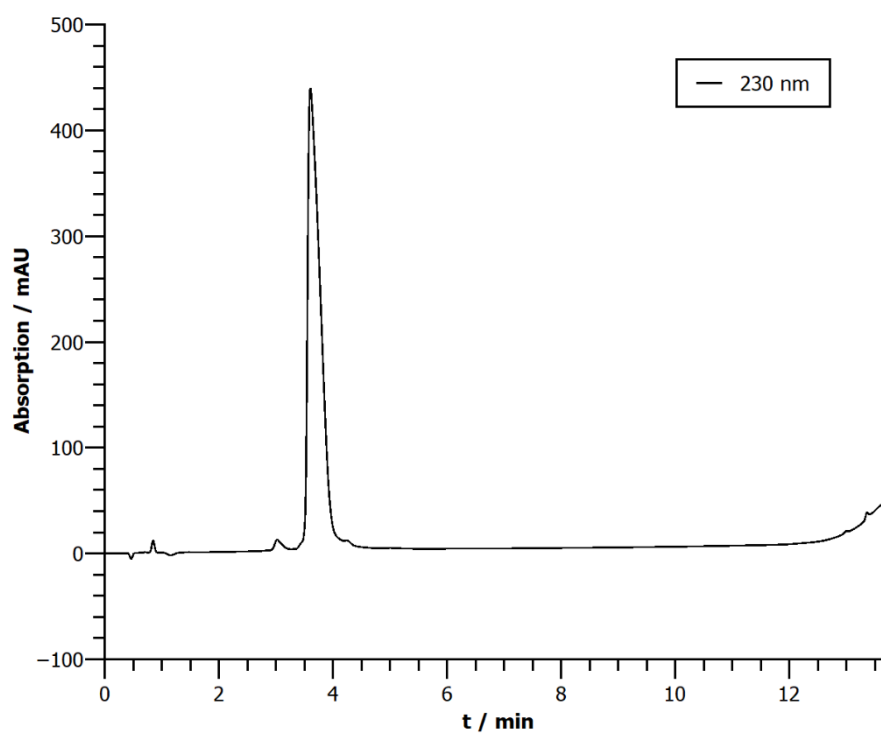
H-K-C-H-W-E-S-T-Cit-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	$\delta(\alpha)$ / ppm	$\delta(\beta)$ / ppm	$\delta(\gamma)$ / ppm	$\delta(\text{sonstige})$ / ppm	$\delta(\text{NH})$ / ppm
Lys ⁰	4.01	1.85	1.38	δ : 1.65, ϵ : 2.95	-
Cys ¹ (red)	4.41	2.65	-	-	n/a
His ²	4.58	3.13	-	aromatisch: δ^2 : 7.10, ϵ^1 : 8.16	8.78
Trp ³	4.66	3.25	-	aromatisch: 2: 7.21, 1(NH): 10.23, 4: 7.53, 7: 7.50, 5: 7.15, 6: 7.25	8.03
Glu ⁴	4.15	1.96, 1.80	2.07	-	8.17
Ser ⁵	4.40	3.90, 3.86	-	-	8.37
Thr ⁶	4.38	4.30	1.22	-	8.34
Cit ⁷	4.15	1.81, 1.69	1.50	δ : 3.08 $\epsilon(\text{NH})$: 6.45 $\eta(\text{NH}_2)$: 5.57	8.05

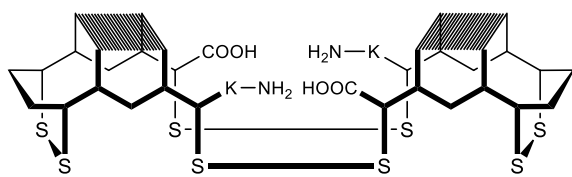


HPLC: $t_R = 3.61$ min



HR-MS (ESI+): für $[C_{44}H_{66}N_{14}O_{14}S_1+1H]^+$, ber.: 1047.4676, gef.: 1047.4671.

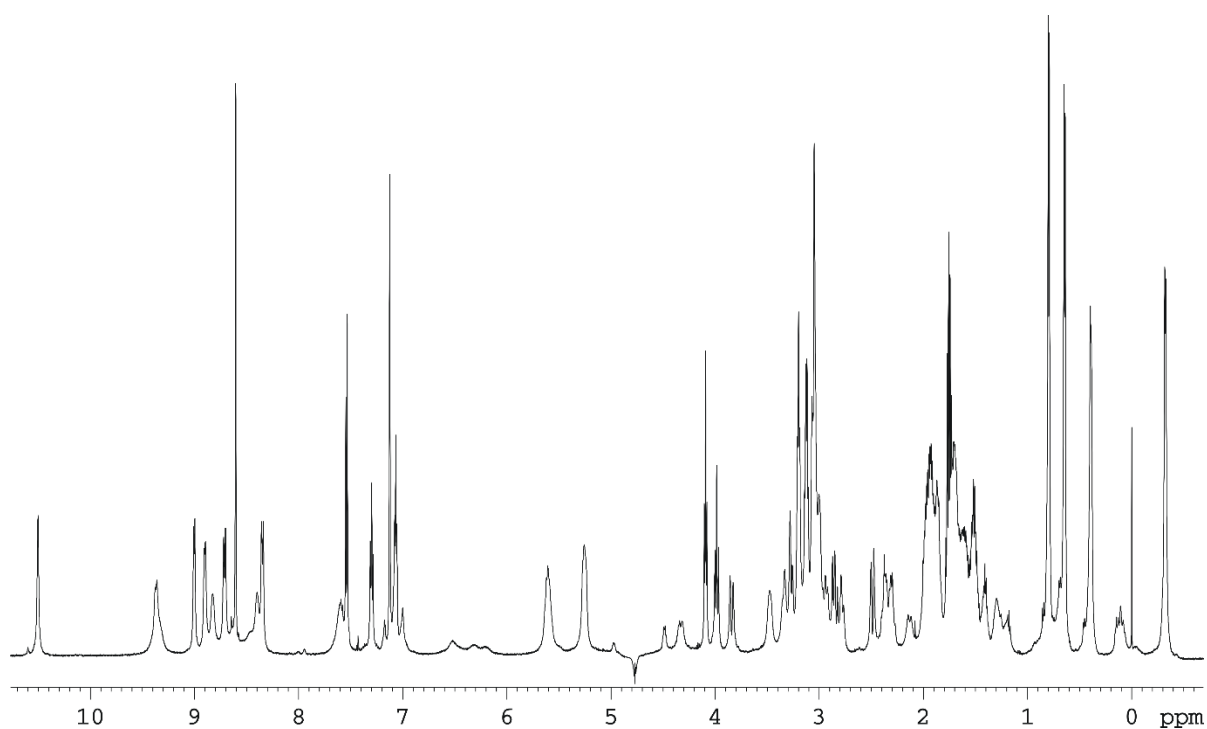
Peptid 28d



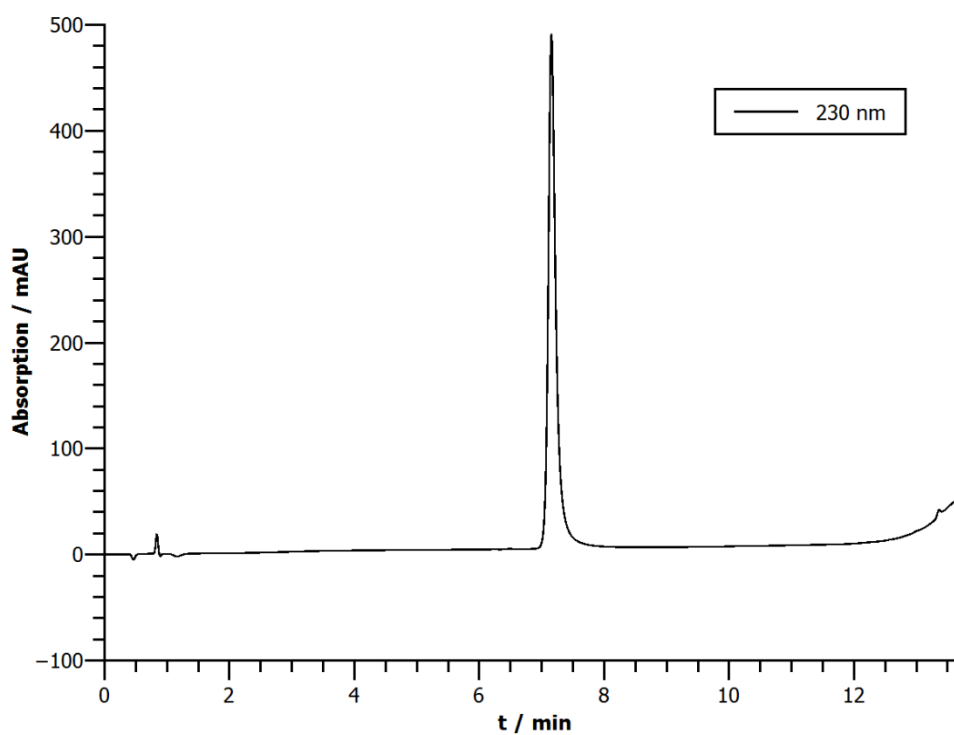
(H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH) (H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH)

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

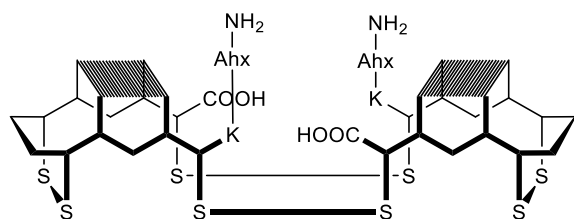
Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.09	1.93	1.47	δ: 1.73, ε: 3.01 ζ(NH ₃ ⁺): 7.60	-
Cys ¹	5.26	3.04, 2.49	-	-	9.02
His ²	4.97	3.29	-	aromatisch: δ ² : 7.06, ε ¹ : 8.53	8.90
Trp ³	4.92	2.93, 2.77	-	aromatisch: 2: 7.00, 1(NH): 10.51, 4: 6.52, 7: 7.54, 5: 6.32, 6: 7.30	8.48
Glu ⁴	5.61	1.99, 1.87	2.36, 2.31	-	9.37
Cys ⁵	5.61	3.00	-	-	9.33
Cit ⁶	4.85	1.89	1.67	δ: 3.20 ε(NH): n/a	8.63
Gly ⁷	4.33, 3.84	-	-	-	n/a
Cys ⁸	5.26	2.14, 0.10	-	-	6.21
Arg ⁹	4.47	1.71, 1.60	1.40	δ: 3.11 ε(NH): 7.07	8.83
Leu ¹⁰	3.47	1.20, -0.03	0.70	δ: 0.40, -0.32	8.41
Val ¹¹	3.99	1.29	0.79, 0.64	-	8.71
Cys ¹²	4.70	3.06, 2.84	-	-	8.35



HPLC: $t_R = 7.16$ min



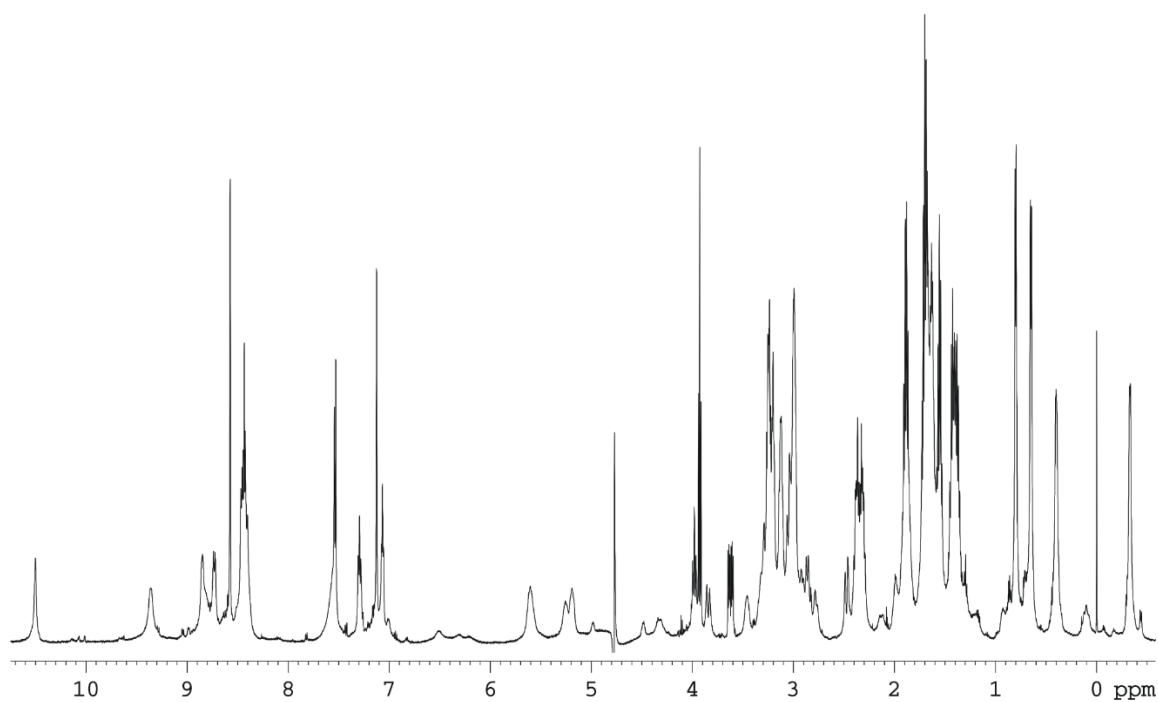
HR-MS (ESI+): für $[C_{130}H_{200}N_{44}O_{34}S_8+3H]^{3+}$, ber.: 1060.7764, gef.: 1060.7755.

Peptid 28-Ahx-d

 (H-K⁻¹-Ahx⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH)

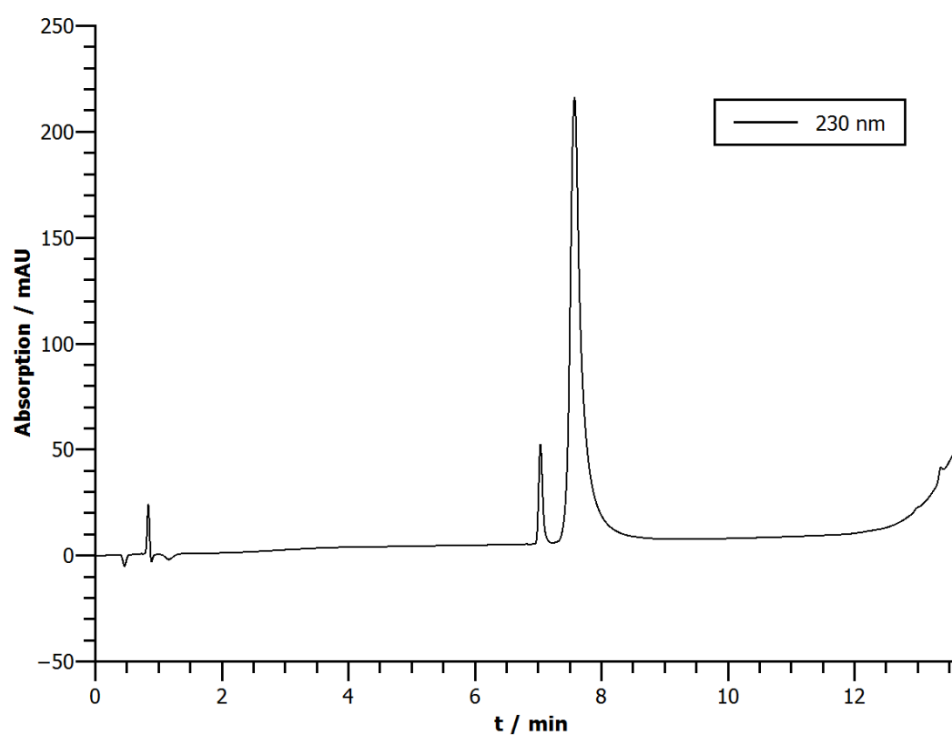
 (H-K⁻¹-Ahx⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH)

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁻¹	3.93	1.90	1.47	δ: 1.71, ε: 3.01 ζ(NH ₃ ⁺): 7.57	n/a
Ahx ⁰	2.34	1.56	1.38	δ: 1.64, ε: 3.24	8.44
Cys ¹	5.19	3.03, 2.48	-	-	8.44
His ²	5.00	3.32	-	aromatisch: δ ² : 7.13, ε ¹ : 8.58	8.85
Trp ³	4.92	2.92, 2.78	-	aromatisch: 2: 7.02, 1(NH): 10.50, 4: 6.51, 7: 7.54, 5: 6.32, 6: 7.30	8.48
Glu ⁴	5.62	1.93, 1.87	2.37, 2.33	-	9.36
Cys ⁵	5.62	3.00	-	-	9.36
Cit ⁶	4.89	1.89	1.67	δ: 3.20 ε(NH): n/a	8.63
Gly ⁷	4.33, 3.84	-	-	-	n/a
Cys ⁸	5.26	2.14, 0.10	-	-	6.21
Arg ⁹	4.47	1.71, 1.60	1.40	δ: 3.11 ε(NH): 7.07	8.83
Leu ¹⁰	3.47	1.19, -0.06	0.70	δ: 0.40, -0.33	8.41
Val ¹¹	3.99	1.30	0.81, 0.65	-	8.74
Cys ¹²	4.76	3.06, 2.85	-	-	8.44

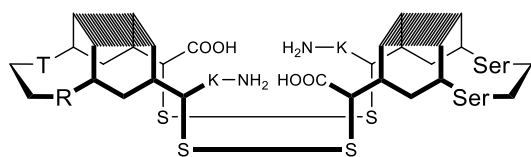


HPLC: $t_R = 7.57$ min



HR-MS (ESI+): für $[C_{142}H_{222}N_{46}O_{36}S_8+4H]^+$, ber.: 852.3762, gef.: 852.3770.

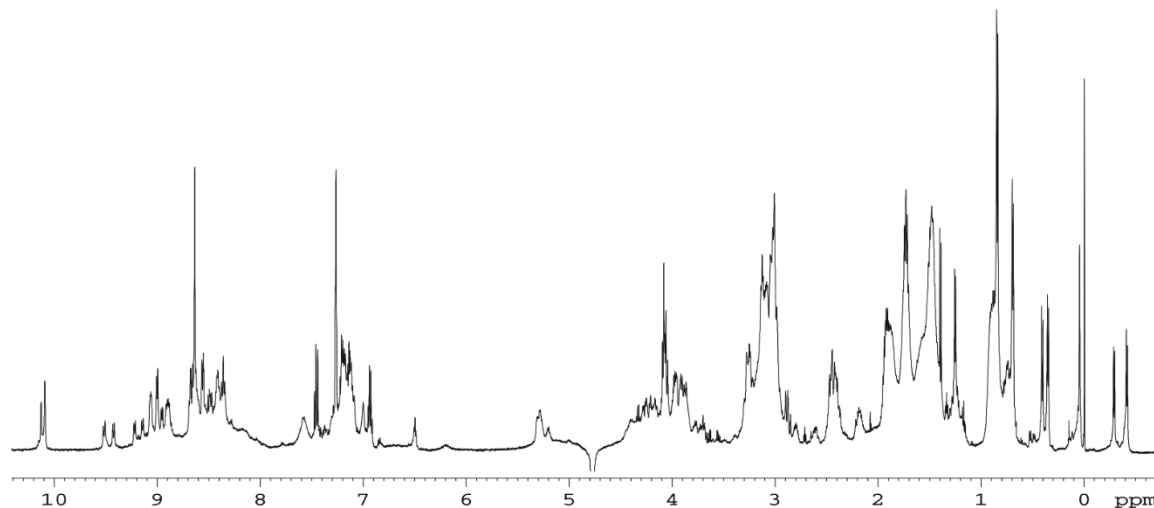
Peptid 29d



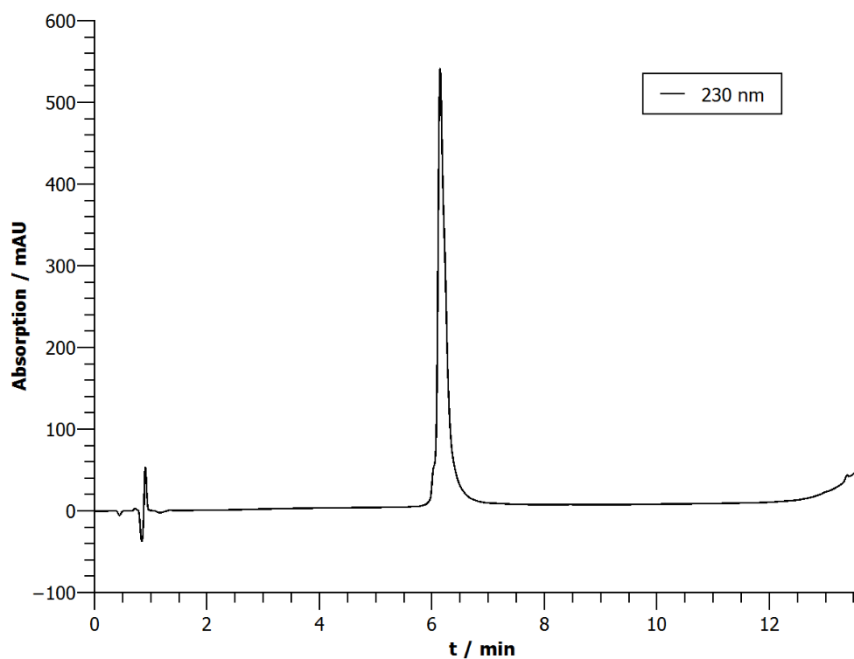
Heterodimer

(H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-T⁵-Cit⁶-G⁷-R⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH) (H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-Cit⁶-G⁷-S⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH)

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).



HPLC: $t_R = 6.14$ min



HR-MS (ESI⁺): für [C₁₃₄H₂₁₃N₄₇O₃₇S₄+3H]³⁺, ber.: 1068.1786, gef.: 1068.1799.

Peptid 30

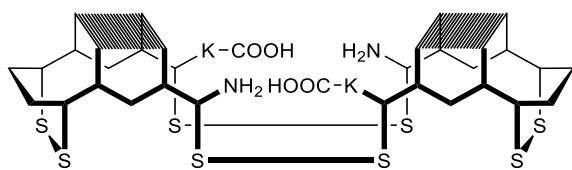
H-K⁰-C¹-H-W-E-c⁵-Cit-G-c⁸-R-L-V-C¹²-OH

(unselektive oxidative Faltung, Kapitel 3.8.5)

HR-MS (ESI+) der reduzierten Spezies:

für [C₆₅H₁₀₄N₂₂O₁₇S₄+2H]²⁺, ber.: 797.3489, gef.: 797.3493.

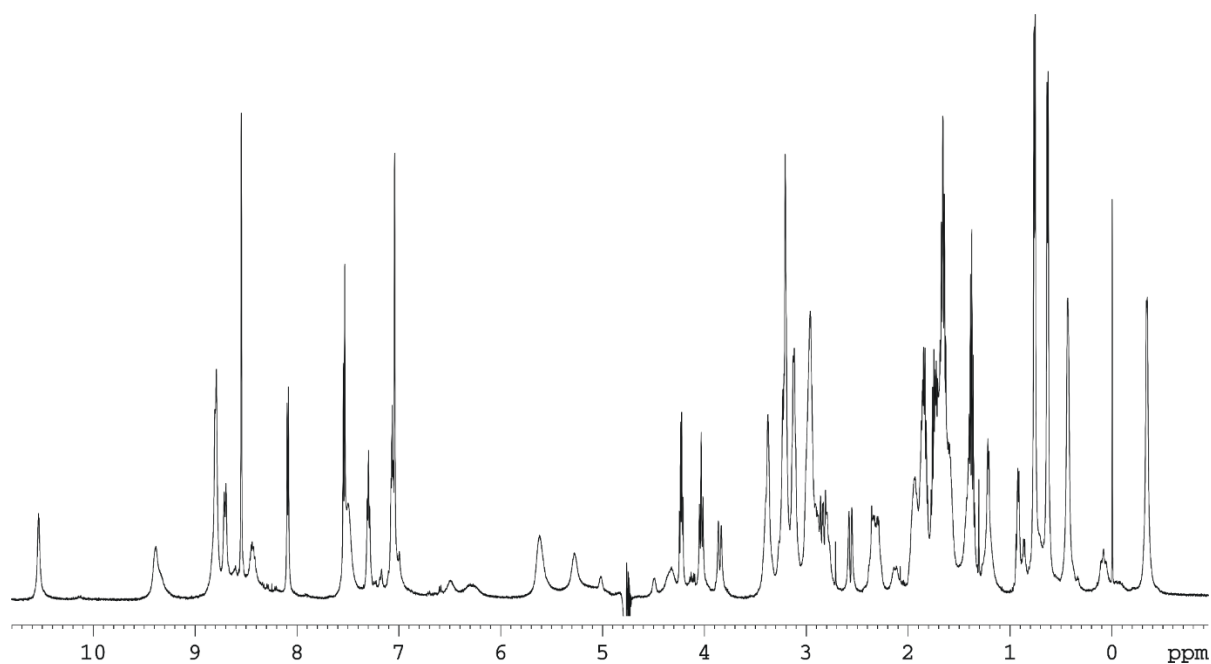
Peptid 31d



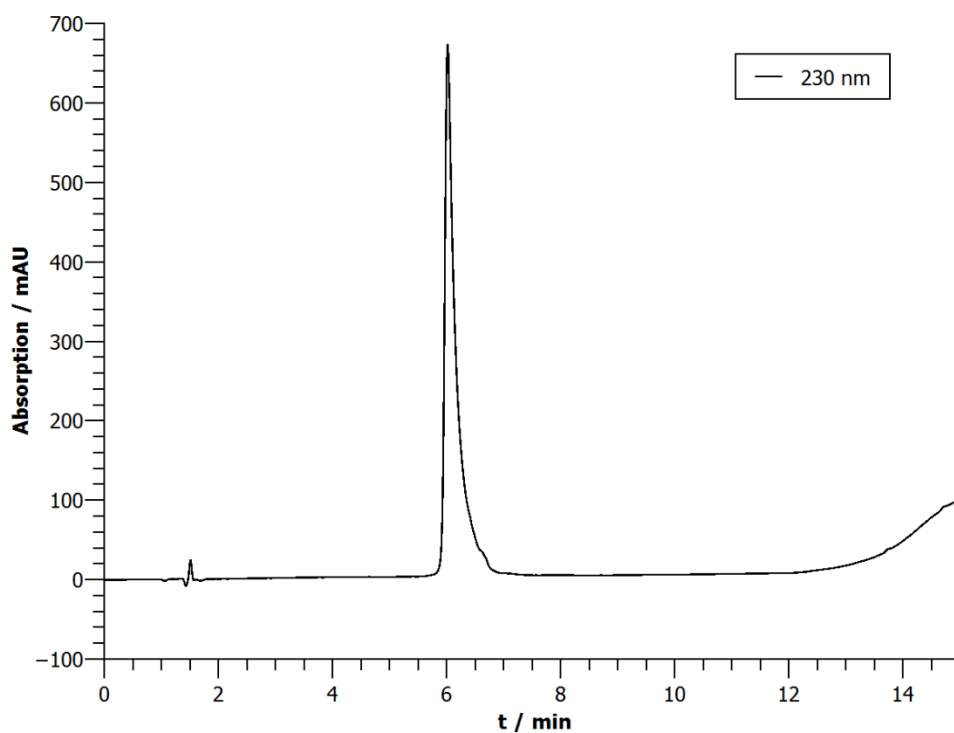
(H-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-K¹³-OH) (H-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-K¹³-OH)

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Cys¹	4.80	3.24, 2.57	-	-	-
His²	5.02	3.38	-	aromatisch: δ ² : 7.04, ε ¹ : 8.55	8.80
Trp³	4.96	2.91, 2.80	-	aromatisch: 2: 7.04, 1(NH): 10.54, 4: 6.50, 7: 7.54, 5: 6.32, 6: 7.30	8.61
Glu⁴	5.63	1.96, 1.86	2.34	-	9.39
Cys⁵	5.62	3.00	-	-	9.35
Cit⁶	4.35	1.80	1.63	δ: 3.19 ε(NH): 7.19	8.56
Gly⁷	4.35, 3.85	-	-	-	n/a
Cys⁸	5.28	2.13, 0.07	-	-	6.25
Arg⁹	4.49	1.71, 1.60	1.38	δ: 3.14 ε(NH): 7.07	8.83
Leu¹⁰	3.40	1.21, -0.07	0.72	δ: 0.44, -0.34	8.45
Val¹¹	4.03	1.21	0.77, 0.64	-	8.71
Cys¹²	4.76	3.22, 2.84	-	-	8.81
Lys¹³	4.23	1.84	1.38	δ: 1.66, ε: 2.97 ζ(NH ₃ ⁺): 7.50	8.09

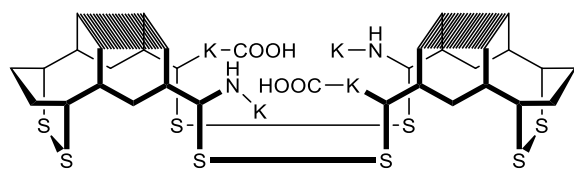


HPLC: $t_R = 6.01$ min (Säule: ACE 3 C18, 150 x 3.0 mm, Gradient: 15-30% B in 10 min
Flussrate: 0.60 mL/min)



HR-MS (ESI+): für $[C_{130}H_{200}N_{44}O_{34}S_8+3H]^{3+}$, ber.: 1060.7764, gef.: 1060.7768.

Peptid 32d

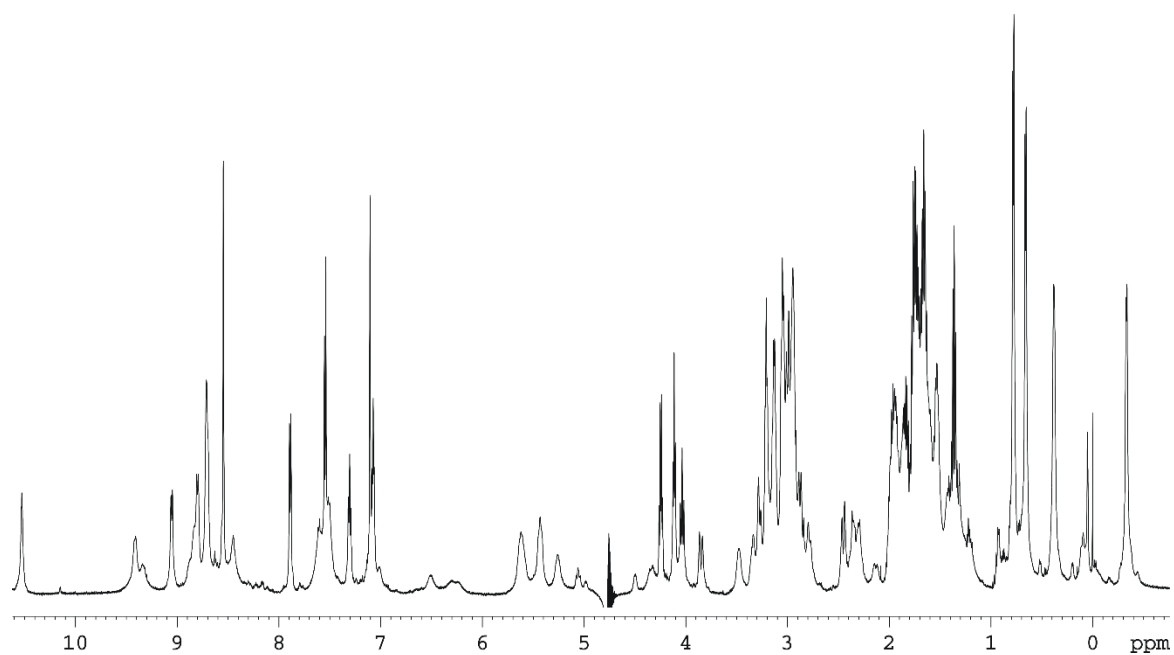


(H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-K¹³-OH)

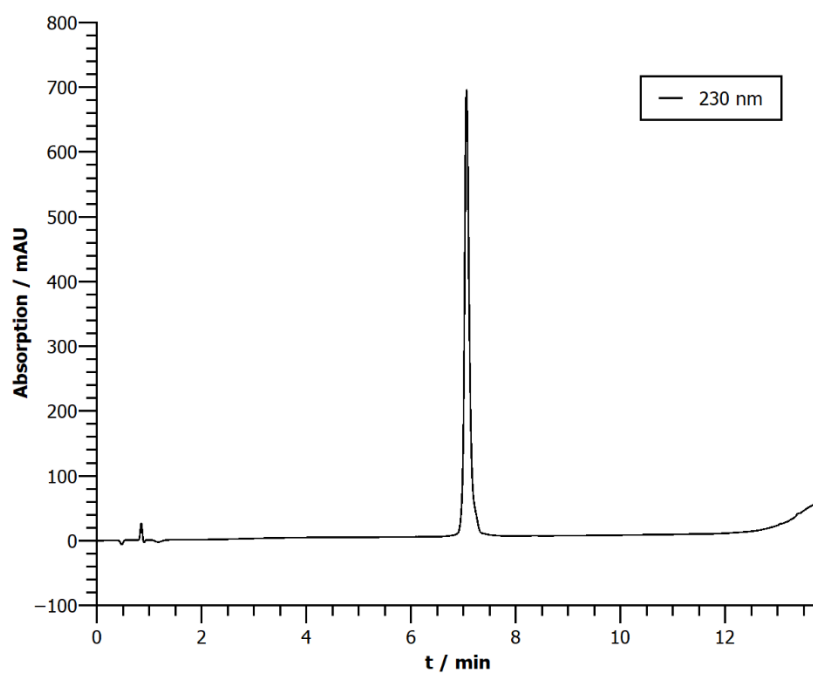
(H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-K¹³-OH)

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys⁰	4.11	1.96	1.53	1.76 ζ(NH ₃ ⁺): 7.61	-
Cys¹	5.43	3.03, 2.46	-	-	9.05
His²	5.02	3.30	-	aromatisch: δ ² : 7.11, ε ¹ : 8.55	8.71
Trp³	4.92	2.94, 2.79	-	aromatisch: 2: 7.01, 1(NH): 10.54, 4: 6.51, 7: 7.54, 5: 6.32, 6: 7.31	8.50
Glu⁴	5.62	1.97, 1.85	2.35	-	9.41
Cys⁵	5.59	3.00	-	-	9.34
Cit⁶	4.35	n/a	n/a	δ: 3.20 ε(NH): n/a	8.58
Gly⁷	4.34, 3.85	-	-	-	n/a
Cys⁸	5.26	2.13, 0.09	-	-	6.24
Arg⁹	4.49	1.71, 1.60	1.41	δ: 3.13 ε(NH): 7.07	8.84
Leu¹⁰	3.48	1.21, -0.07	0.72	δ: 0.38, -0.33	8.45
Val¹¹	4.03	1.31	0.78, 0.66	-	8.70
Cys¹²	4.76	2.99, 2.86	-	-	8.80
Lys¹³	4.24	1.83	1.36	δ: 1.70, ε: 2.93 ζ(NH ₃ ⁺): 7.52	7.89

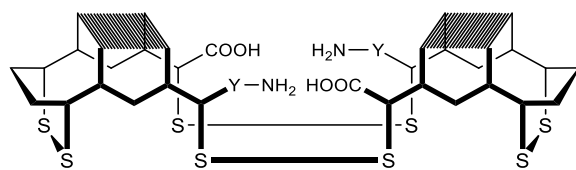


HPLC: $t_R = 7.06$ min



HR-MS (ESI+): für $[C_{142}H_{224}N_{48}O_{36}S_8+4H]^{4+}$, ber.: 859.8816, gef.: 859.8812.

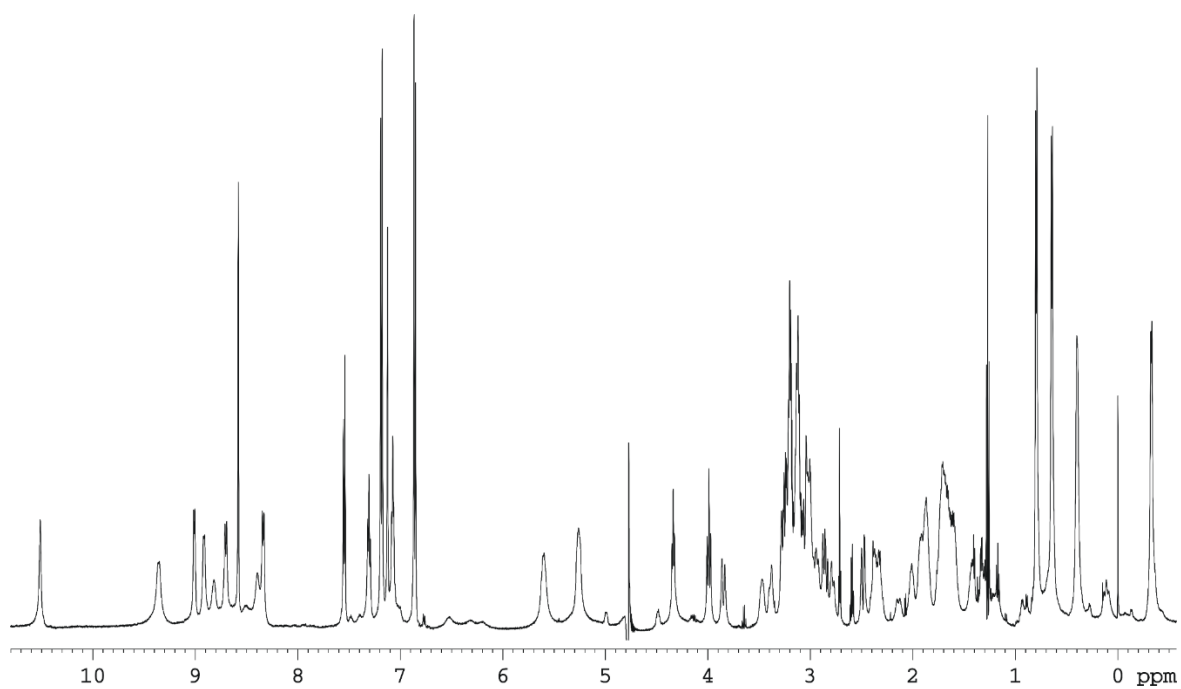
Peptid 33d



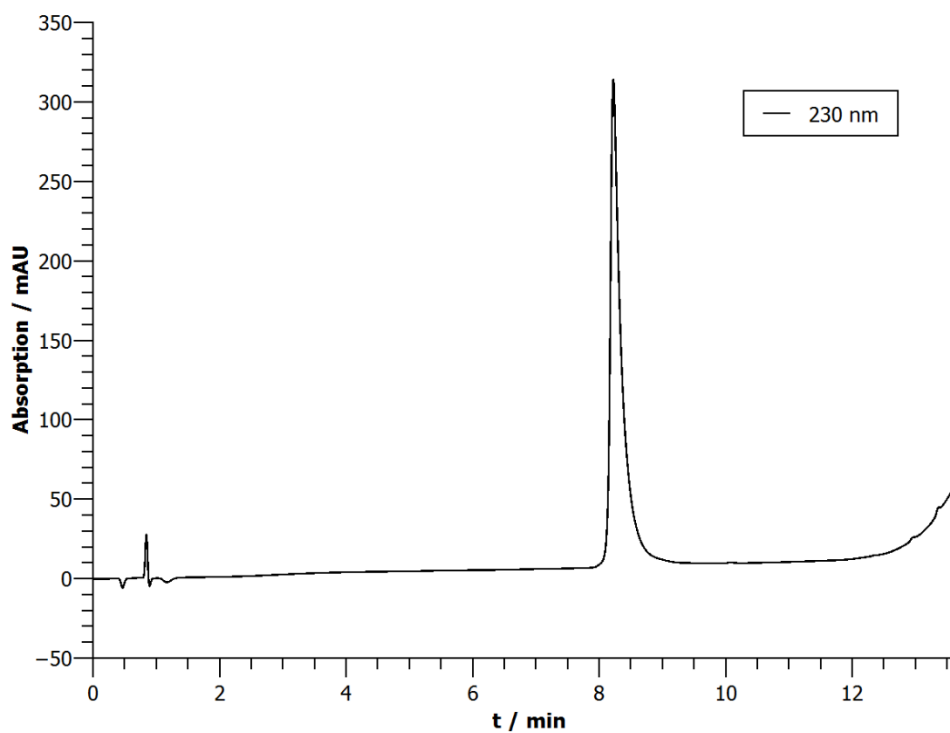
(H-Y⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH) (H-Y⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-Cit⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH)

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Tyr⁰	4.34	3.25, 3.10	-	aromatisch: 2,6: 7.19 3,5: 6.86	-
Cys¹	5.26	3.04, 2.49	-	-	9.01
His²	5.00	3.40, 3.27	-	aromatisch: δ ² : 7.13, ε ¹ : 8.58	8.92
Trp³	4.92	2.95, 2.78	-	aromatisch: 2: 7.02, 1(NH): 10.52, 4: 6.53, 7: 7.55, 5: 6.32, 6: 7.31	8.48
Glu⁴	5.60	2.02, 1.87	2.38, 2.30	-	9.36
Cys⁵	5.60	3.01	-	-	9.35
Cit⁶	4.89	1.90	1.68	δ: 3.21 ε(NH): n/a	8.64
Gly⁷	4.33, 3.84	-	-	-	n/a
Cys⁸	5.26	2.15, 0.11	-	-	6.21
Arg⁹	4.48	1.71, 1.60	1.42	δ: 3.14 ε(NH): 7.07	8.82
Leu¹⁰	3.47	1.19, -0.05	0.72	δ: 0.40, -0.33	8.39
Val¹¹	3.99	1.31	0.80, 0.65	-	8.71
Cys¹²	4.70	3.07, 2.85	-	-	8.34

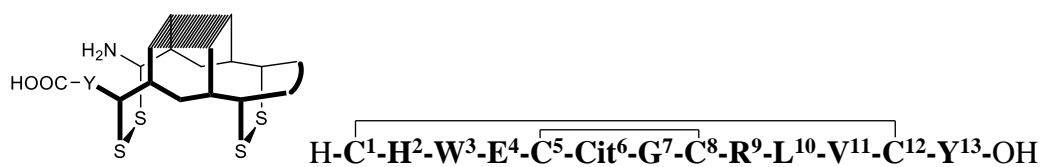


HPLC: $t_R = 8.22$ min

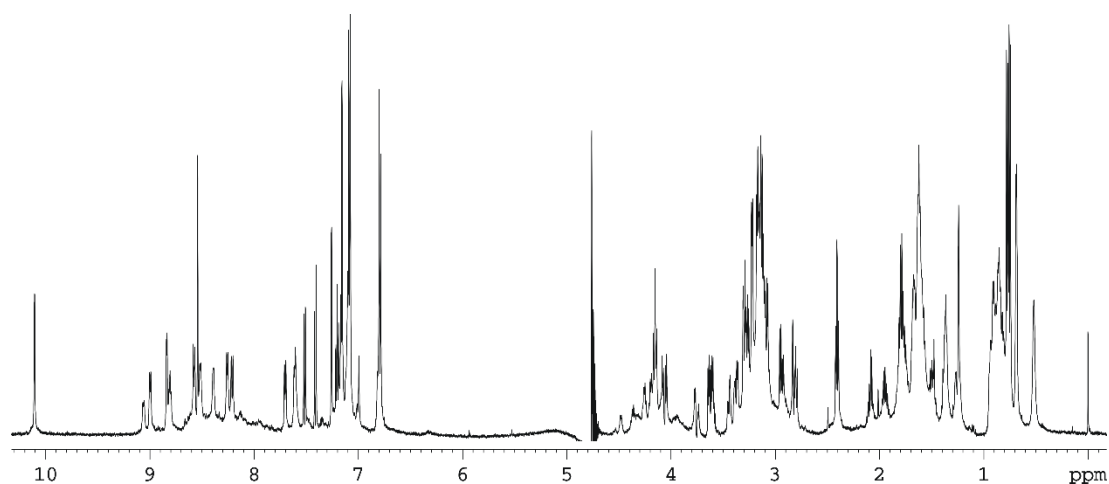


HR-MS (ESI+): für $[C_{136}H_{194}N_{42}O_{36}S_8+3H]^{3+}$, ber.: 1084.0887, gef.: 1084.0921.

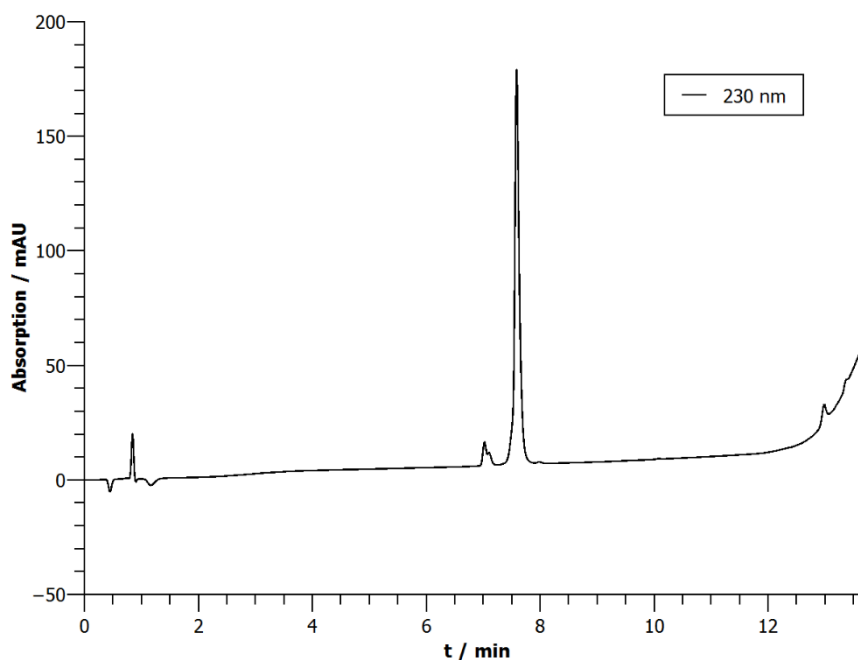
Peptid 34m



¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 4.4)/D₂O 9:1).

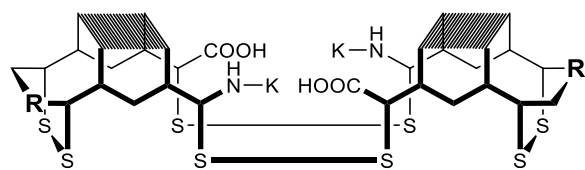


HPLC: $t_R = 7.58$ min



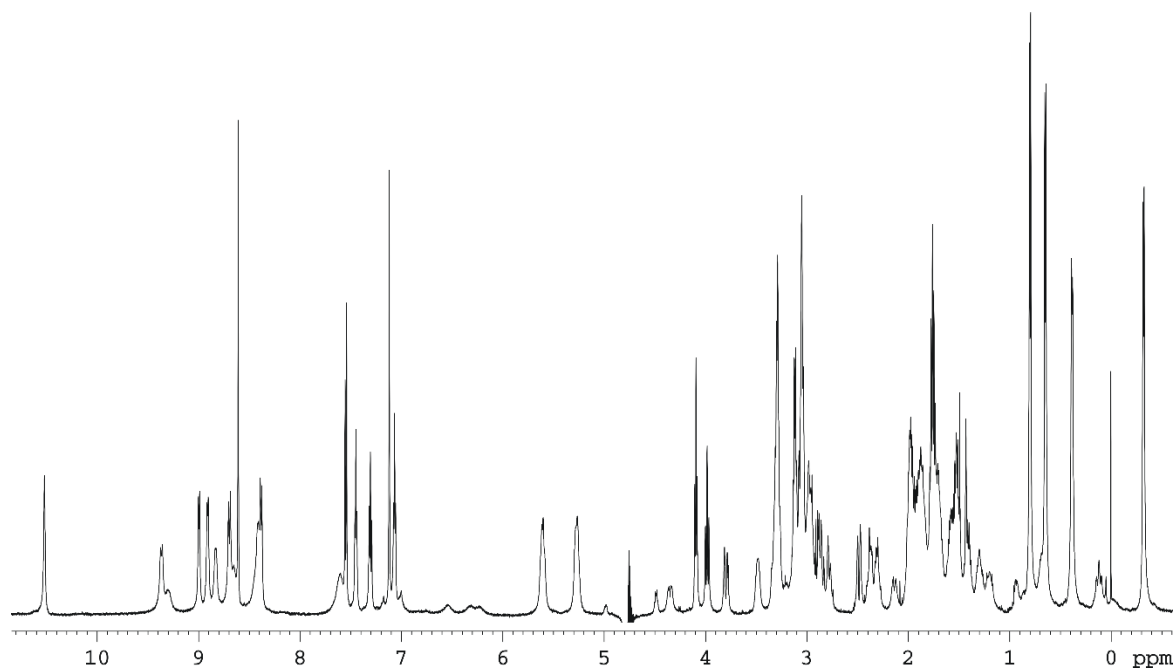
HR-MS (ESI+): für $[C_{68}H_{97}N_{21}O_{18}S_4+2H]^{2+}$, ber.: 812.8174, gef.: 812.8187.

Peptid 35d

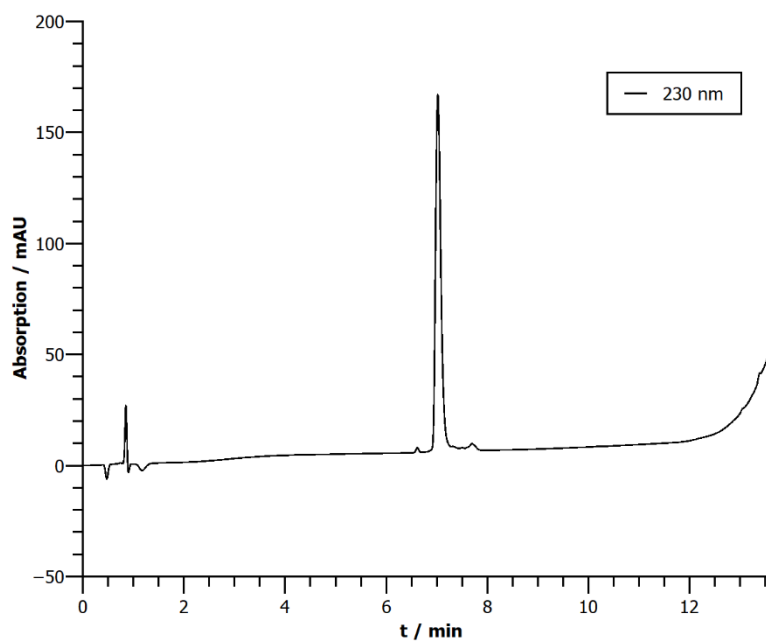


(H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-R⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH) (H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-C⁵-R⁶-G⁷-C⁸-R⁹-L¹⁰-V¹¹-C¹²-OH)

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

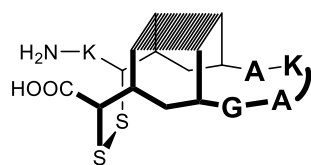


HPLC: $t_R = 7.02$ min



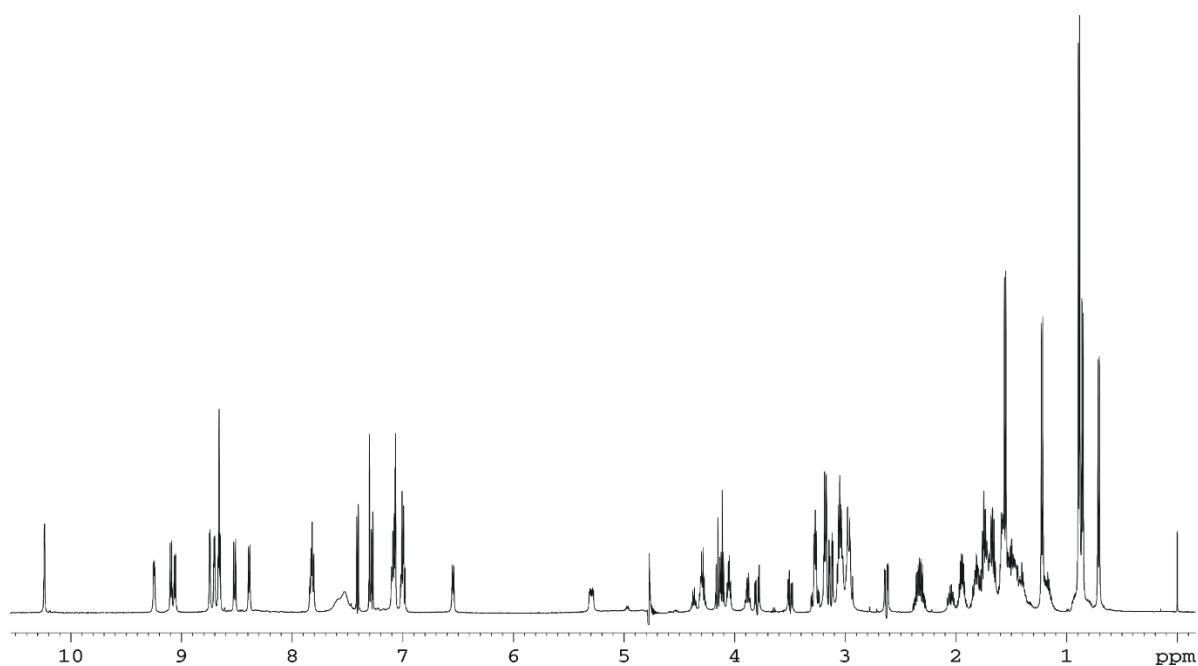
HR-MS (ESI⁺): für [C₁₃₀H₂₀₂N₄₆O₃₂S₈+6H]⁶⁺, ber.: 530.5638, gef.: 530.5640.

Peptid 36m

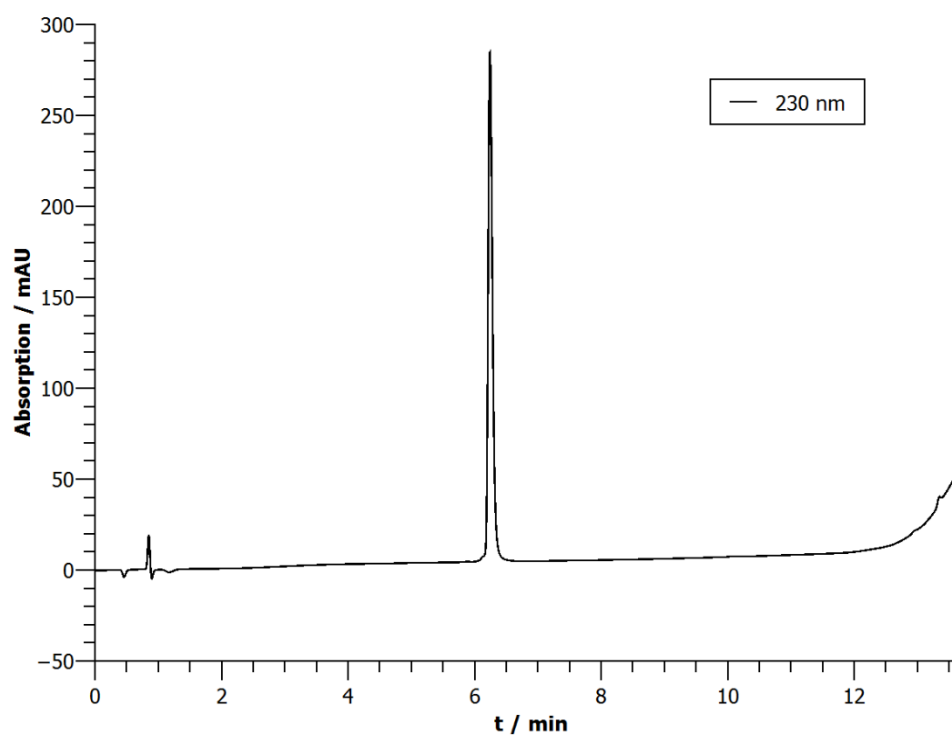


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.11	1.94	1.49	δ: 1.75, ε: 3.04 ζ(NH ₃ ⁺): 7.59	-
Cys ¹	5.30	3.17, 2.63	-	-	9.06
His ²	4.97	3.27	-	aromatisch: δ ² : 7.31, ε ¹ : 8.66	9.10
Trp ³	4.55	3.19	-	aromatisch: 2: 7.08, 1(NH): 10.24, 4: 7.28, 7: 7.41, 5: 7.00, 6: 7.09	9.25
Glu ⁴	4.59	2.05, 1.73	2.34	-	7.81
Ala ⁵	3.88	1.56	-	-	8.74
Lys ⁶	4.05	1.81	1.43	δ: 1.68, ε: 3.04 ζ(NH ₃ ⁺): 7.53	8.70
Ala ⁷	4.29	1.22	-	-	7.09
Gly ⁸	3.80, 3.50	-	-	-	7.83
Arg ⁹	4.30	1.18	1.72, 1.50	δ: 3.08 ε(NH): 7.03	6.55
Leu ¹⁰	4.29	1.58	1.58	δ: 0.89, 0.86	8.40
Val ¹¹	4.17	1.67	0.89, 0.71	-	8.66
Cys ¹²	4.73	3.14, 2.97	-	-	8.52

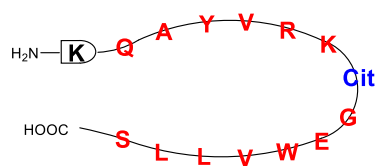


HPLC: $t_R = 6.24$ min



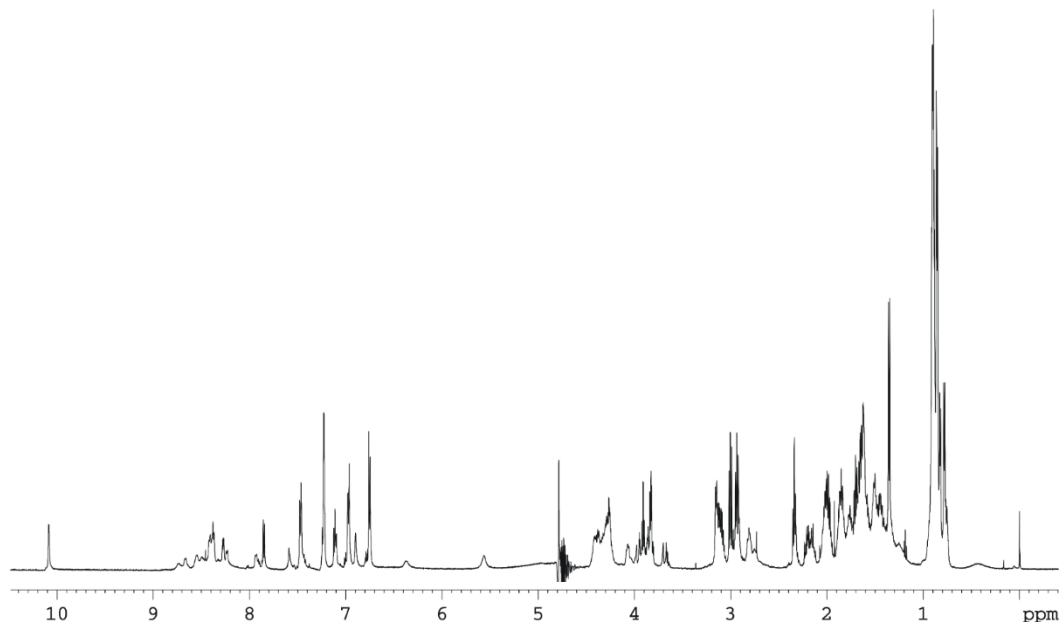
HR-MS (ESI+): für $[C_{65}H_{103}N_{21}O_{16}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 749.8739, gef.: 749.8735.

Peptid 37

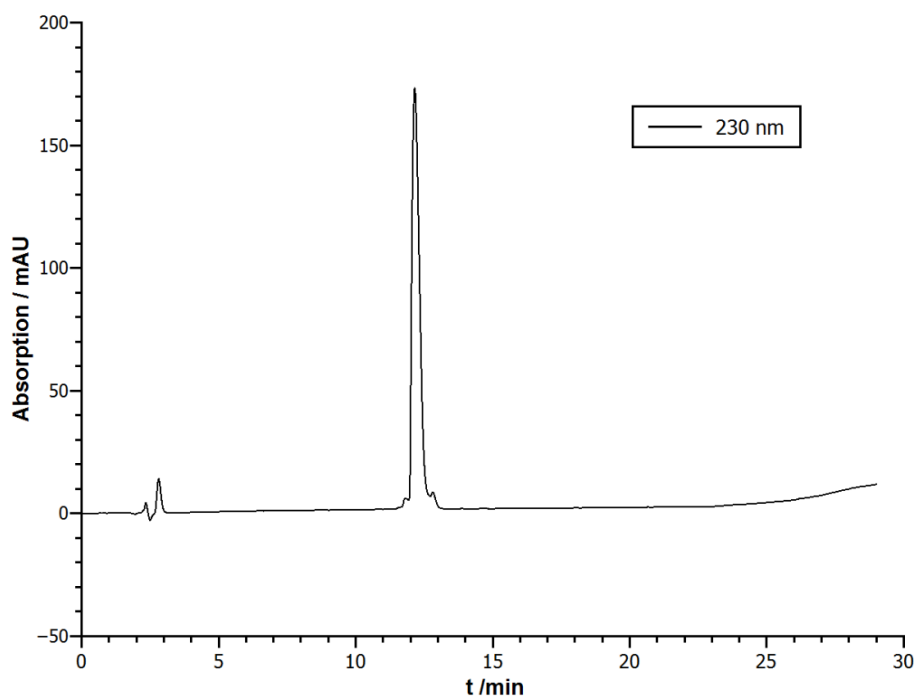


H-K-Q-A-Y-V-R-K-Cit-G-E-W-V-L-L-S-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

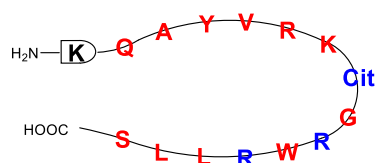


HPLC: $t_R = 12.15$ min



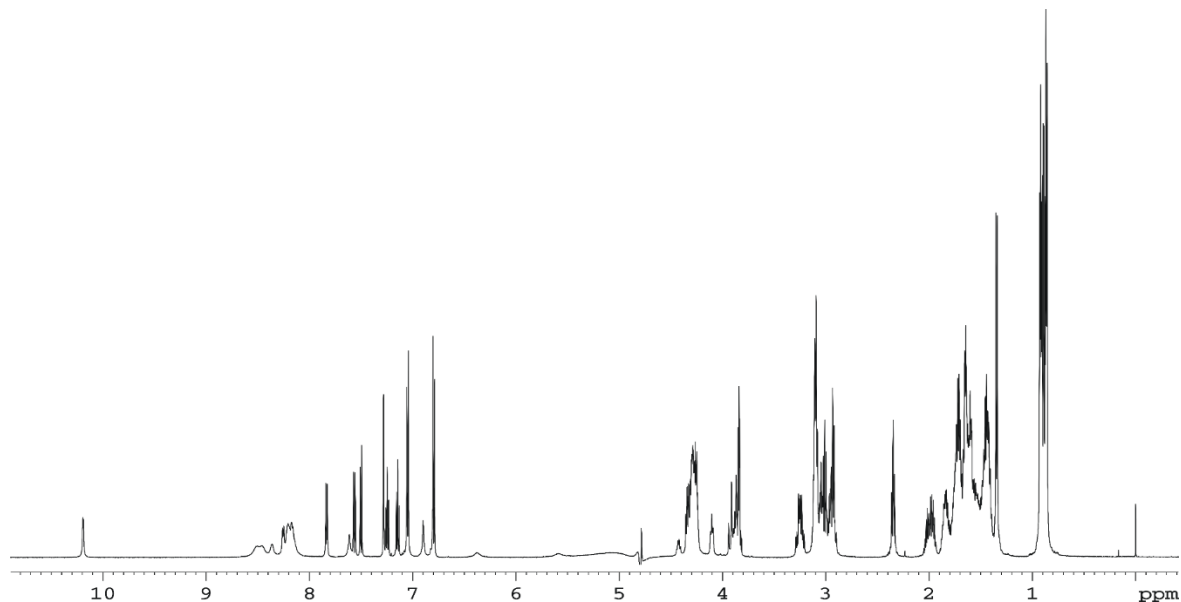
HR-MS (ESI+): für [C₈₄H₁₃₆N₂₄O₂₂+1H]¹⁺, ber.: 918.0218, gef.: 918.0234.

Peptid 38

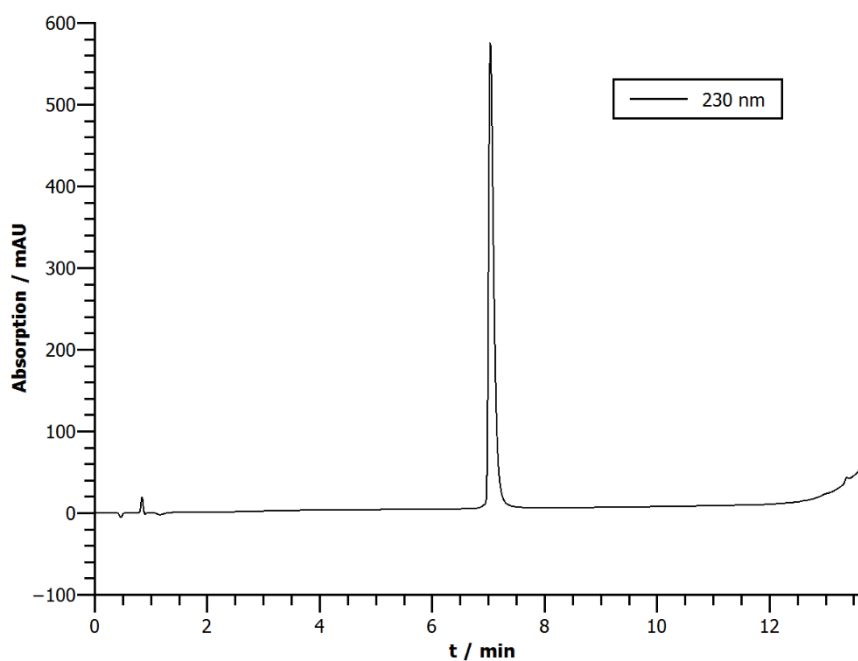


H-K-Q-A-Y-V-R-K-Cit-G-R-W-R-L-L-S-OH

$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

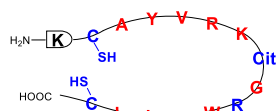


HPLC: $t_R = 7.03 \text{ min}$



HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{86}\text{H}_{144}\text{N}_{30}\text{O}_{20}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 960.0673, gef.: 960.0653.

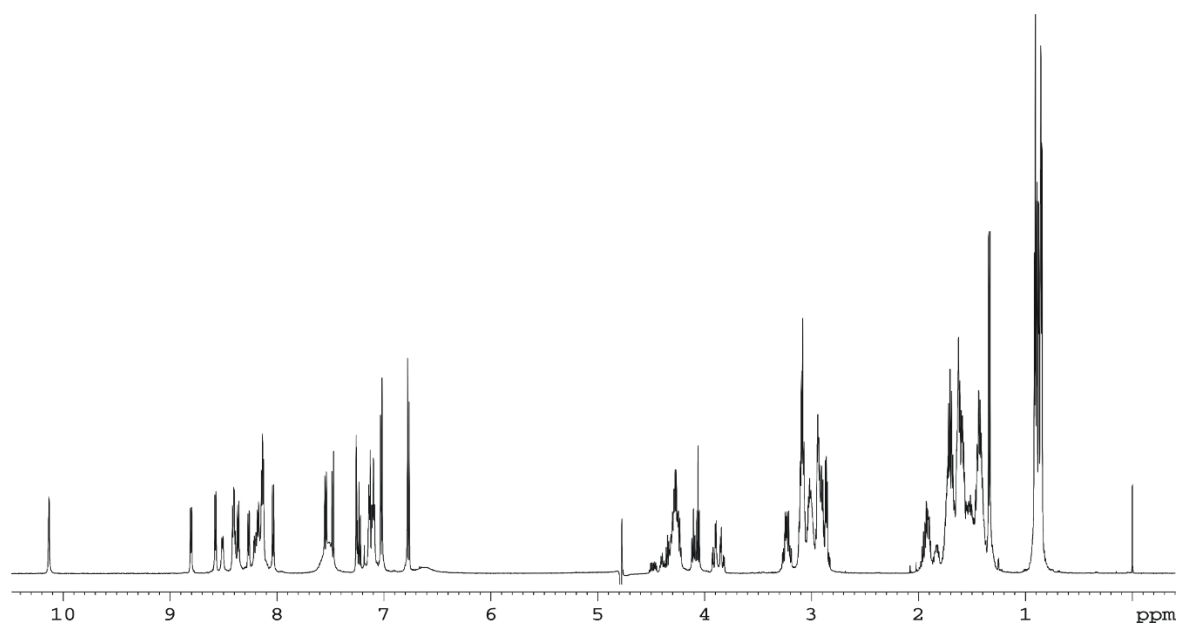
Peptid 39r



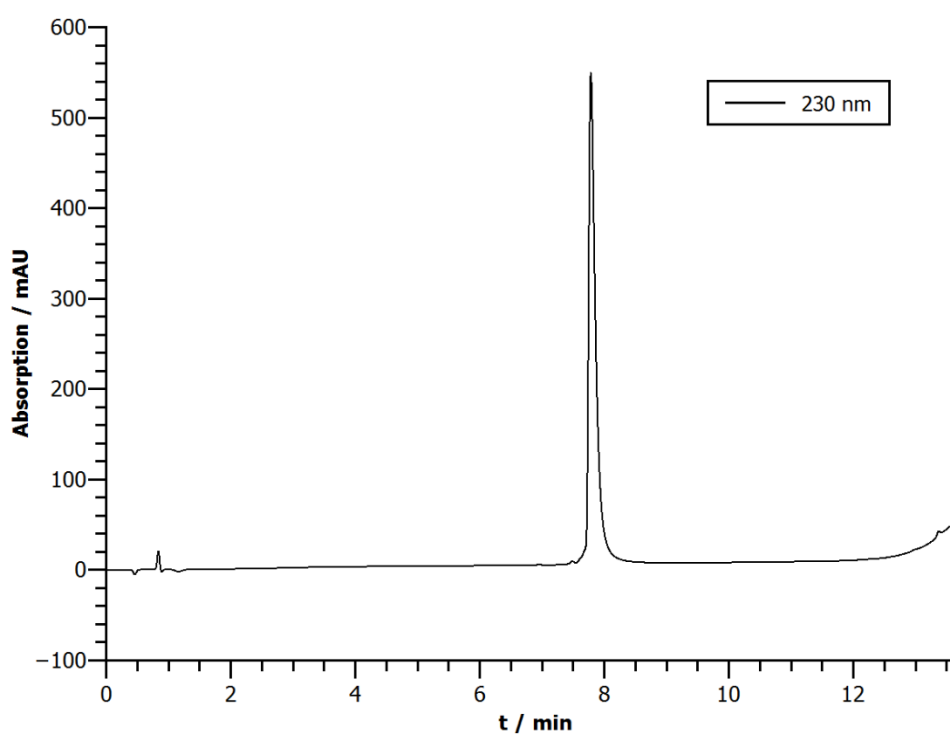
H-K-C-A-Y-V-R-K-Cit-G-R-W-R-L-L-C-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.06	1.90	1.44	δ: 1.70, ε: 3.00 ζ(NH ₃ ⁺): 7.56	-
Cys ¹	4.50	2.87	-	-	8.81
Ala ²	4.34	1.34	-	-	8.58
Tyr ³	4.67	2.92	-	aromatisch: 2,6: 7.03 3,5: 6.77	8.13
Val ⁴	4.12	1.95	0.88	-	8.21
Arg ⁵	4.24	1.71	1.53, 1.45	δ: 3.03, ε(NH): 7.10	8.35
Lys ⁶	4.30	1.73	1.39, 1.33	δ: 1.62, ε: 2.92 ζ(NH ₃ ⁺): 7.52	8.42
Cit ⁷	4.28	1.84, 1.72	1.51	δ: 3.08, ε(NH): n/a	8.51
Gly ⁸	3.92, 3.84	-	-	-	8.40
Arg ⁹	4.27	1.69, 1.62	1.41	δ: 3.08, ε(NH): 7.14	8.13
Trp ¹⁰	4.69	3.24	-	aromatisch: 2: 7.26, 1(NH): 10.14, 4: 7.48, 7: 7.55, 5: 7.12, 6: 7.23	8.18
Arg ¹¹	4.27	1.71, 1.60	1.41	δ: 3.10 ε(NH): 7.13	8.15
Leu ¹²	4.27	1.61	1.61	δ: 0.90, 0.85	8.14
Leu ¹³	4.41	1.61	1.61	δ: 0.91, 0.85	8.27
Cys ¹⁴	4.46	2.94	-	-	8.04

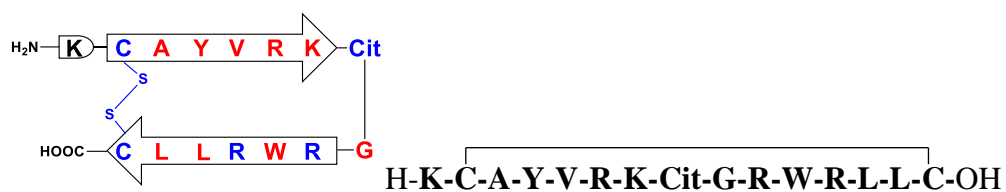


HPLC: $t_R = 7.78$ min



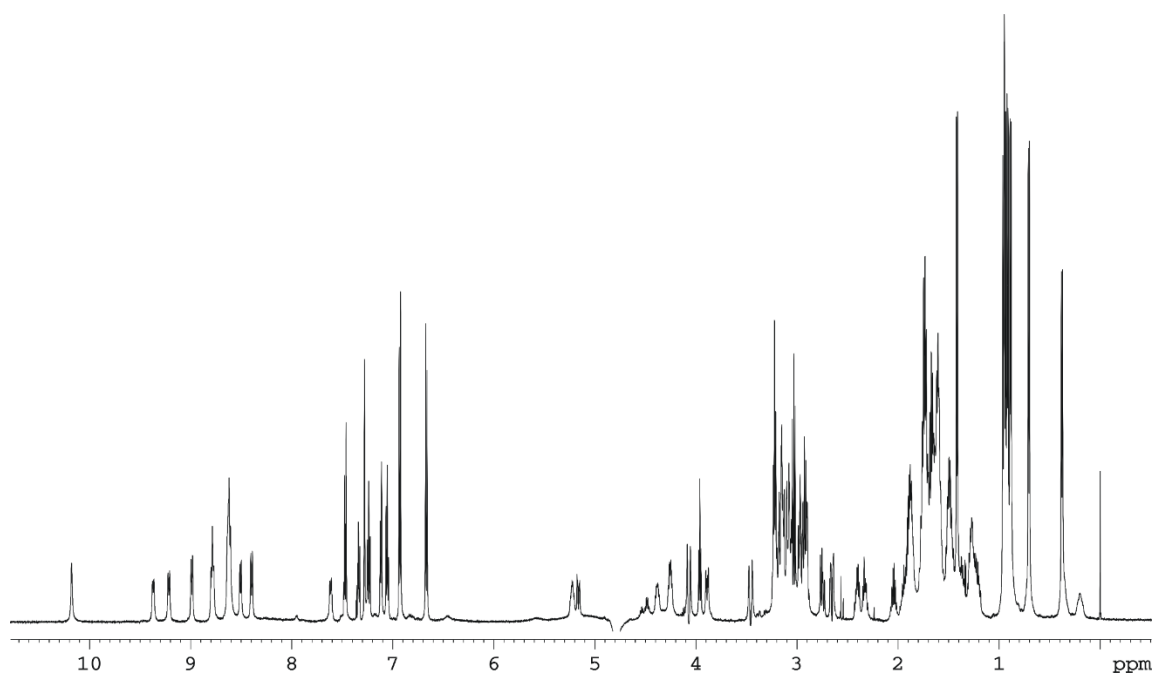
HR-MS (ESI+): für $[C_{84}H_{141}N_{29}O_{18}S_2+3H]^{3+}$, ber.: 637.3565, gef.: 637.3560.

Peptid 39o

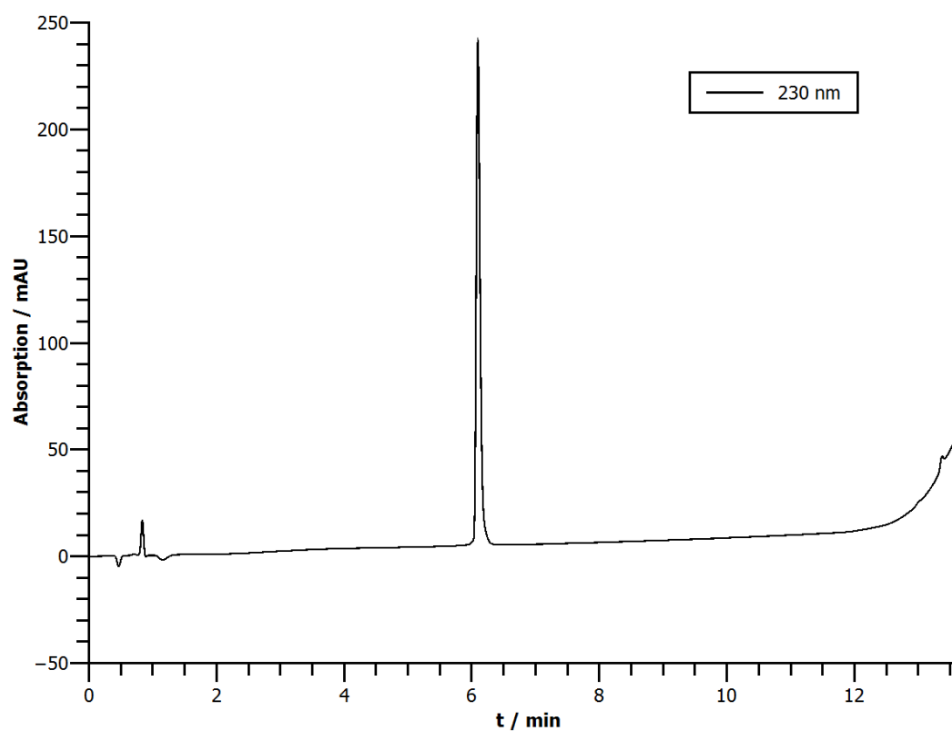


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	3.96	1.89	1.48	δ: 1.73, ε: 3.03	-
Cys ¹	5.16	3.09, 2.66	-	-	n/a
Ala ²	4.54	1.42	-	-	8.79
Tyr ³	5.21	2.92, 2.75	-	aromatisch: 2,6: 6.93 3,5: 6.67	8.61
Val ⁴	4.64	2.04	0.94	-	9.21
Arg ⁵	4.25	1.26, 0.20	0.78, 0.36	δ: 2.39, ε(NH): n/a	8.51
Lys ⁶	4.48	1.68	1.49	δ: 1.58, ε: 2.93	8.62
Cit ⁷	3.88	1.94, 1.75	1.50	δ: 3.10, ε(NH): 6.46	n/a
Gly ⁸	4.09, 3.47	-	-	-	8.60
Arg ⁹	4.67	1.87, 1.73	1.60	δ: 3.22, ε(NH): n/a	7.62
Trp ¹⁰	4.89	3.07, 2.96	-	aromatisch: 2: 7.28, 1(NH): 10.19, 4: 7.12, 7: 7.47, 5: 7.06, 6: 7.25	8.77
Arg ¹¹	4.78	1.88, 1.76	1.64	δ: 3.19 ε(NH): n/a	9.37
Leu ¹²	4.37	1.73	1.26	δ: 0.72, 0.32	8.62
Leu ¹³	4.70	1.75	1.58	δ: 0.89	8.99
Cys ¹⁴	4.74	3.17, 2.96	-	-	8.40

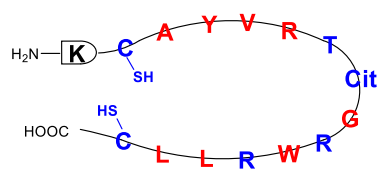


HPLC: $t_R = 6.10 \text{ min}$



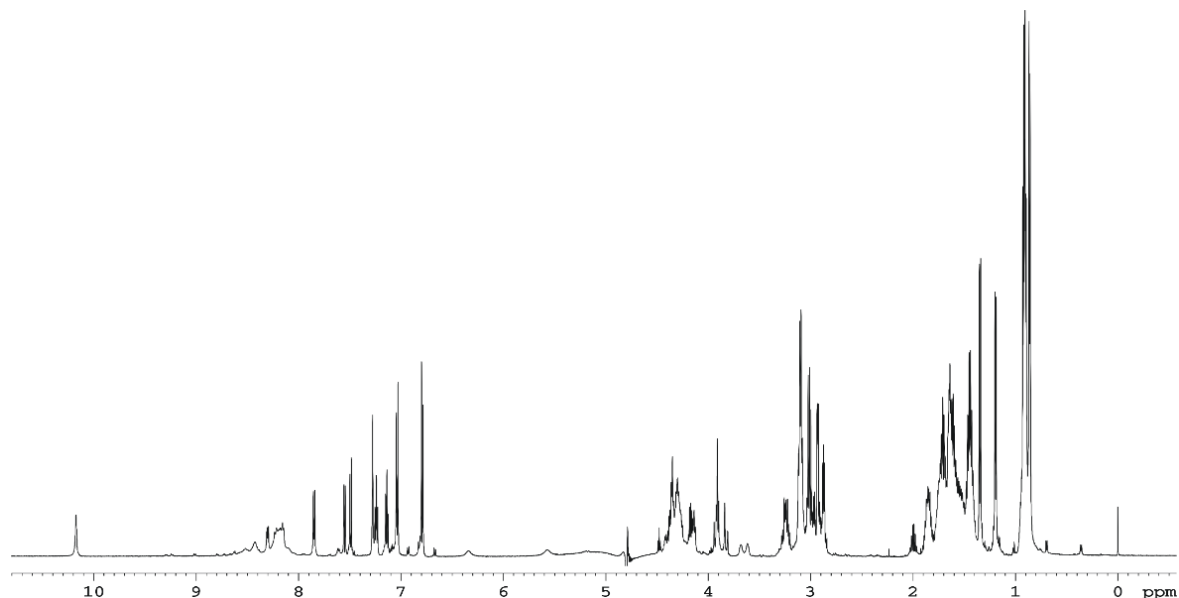
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{84}\text{H}_{139}\text{N}_{29}\text{O}_{18}\text{S}_2 + 3\text{H}]^{3+}$, ber.: 636.9847, gef.: 636.7849.

Peptid 40r

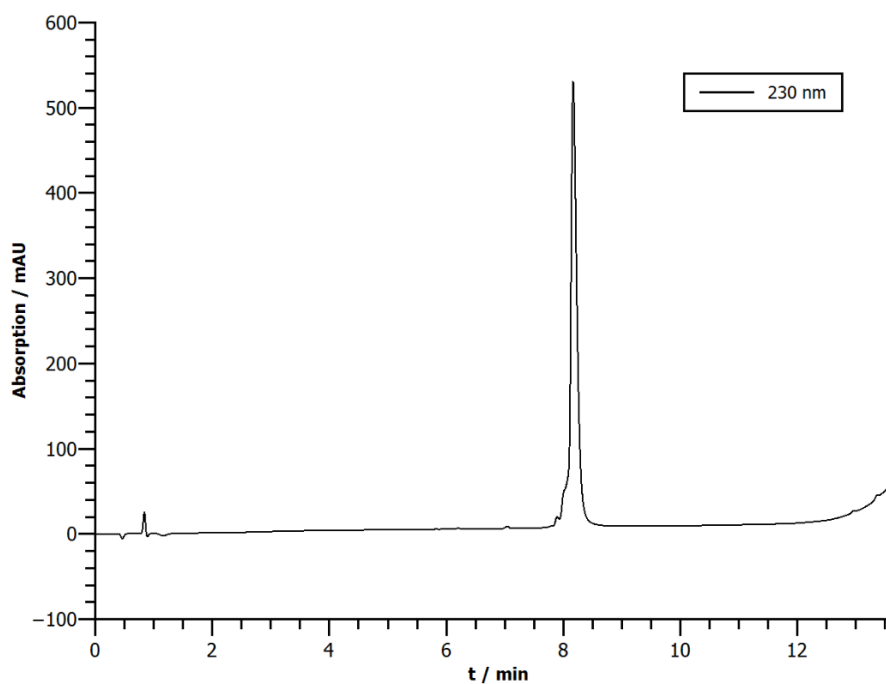


H-K-C-A-Y-V-R-T-Cit-G-R-W-R-L-L-C-OH

$^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

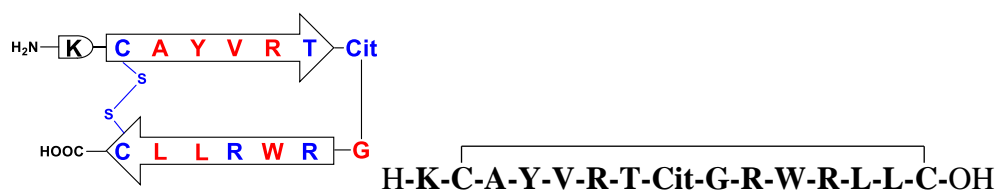


HPLC: $t_R = 8.16$ min



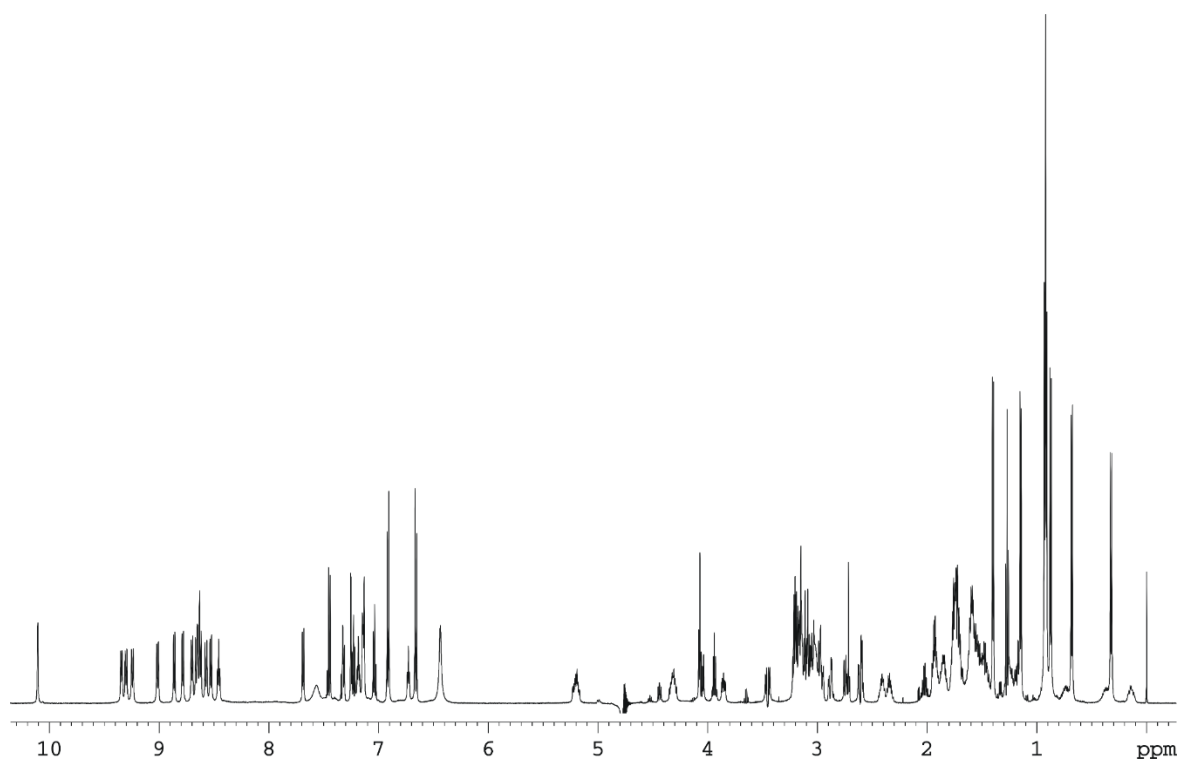
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{82}\text{H}_{136}\text{N}_{28}\text{O}_{19}\text{S}_2 + 3\text{H}]^{3+}$, ber.: 628.0065, gef.: 628.0052.

Peptid 40o

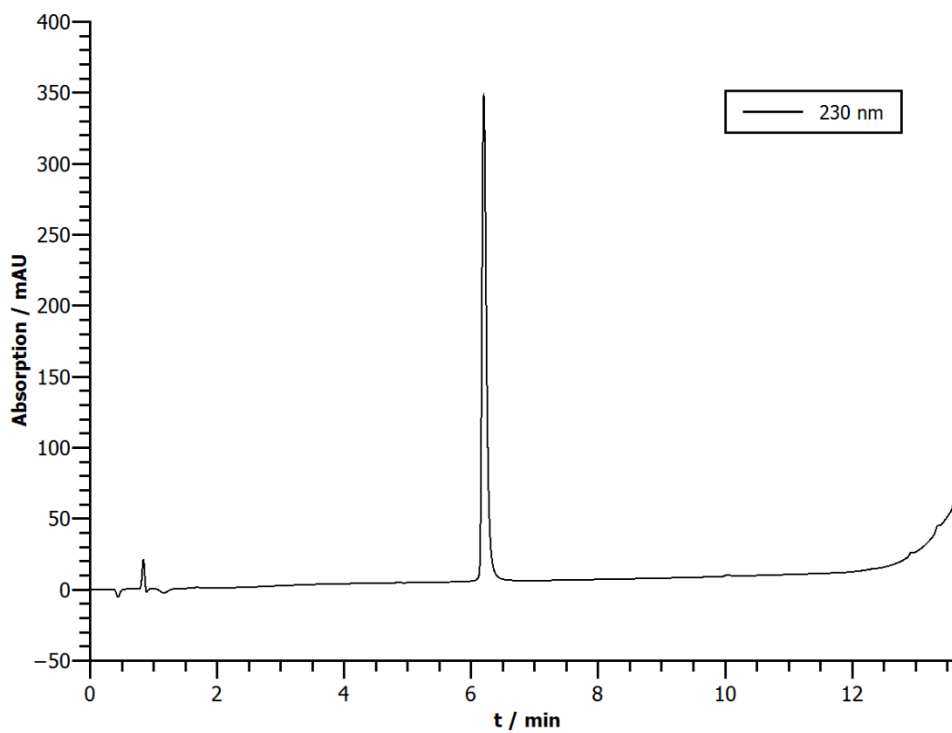


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.07	1.89	1.48	δ: 1.73, ε: 3.02	-
Cys ¹	5.21	3.09, 2.60	-	-	8.86
Ala ²	4.53	1.40	-	-	8.78
Tyr ³	5.18	2.89, 2.73	-	aromatisch: 2,6: 6.92 3,5: 6.66	8.63
Val ⁴	4.61	2.02	0.92	-	9.24
Arg ⁵	4.33	1.25, 0.15	0.73, 0.37	δ: 2.39, ε(NH): 6.73	8.53
Thr ⁶	4.43	3.95	1.15	-	8.66
Cit ⁷	3.86	1.92, 1.74	1.51	δ: 3.10, ε(NH): 6.44	9.34
Gly ⁸	4.06, 3.46	-	-	-	8.46
Arg ⁹	4.65	1.87, 1.74	1.59	δ: 3.20, ε(NH): 7.19	7.69
Trp ¹⁰	4.89	3.05, 2.97	-	aromatisch: 2: 7.28, 1(NH): 10.11, 4: 7.11, 7: 7.45, 5: 7.04, 6: 7.23	8.70
Arg ¹¹	4.79	1.86, 1.74	1.59	δ: 3.16 ε(NH): 7.13	9.30
Leu ¹²	4.33	1.70	1.18	δ: 0.67, 0.32	8.62
Leu ¹³	4.68	1.76	1.54	δ: 0.90	9.01
Cys ¹⁴	4.86	3.15, 2.96	-	-	8.57

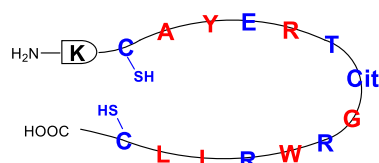


HPLC: $t_R = 6.20$ min



HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{82}\text{H}_{134}\text{N}_{28}\text{O}_{19}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 940.4983, gef.: 940.9985.

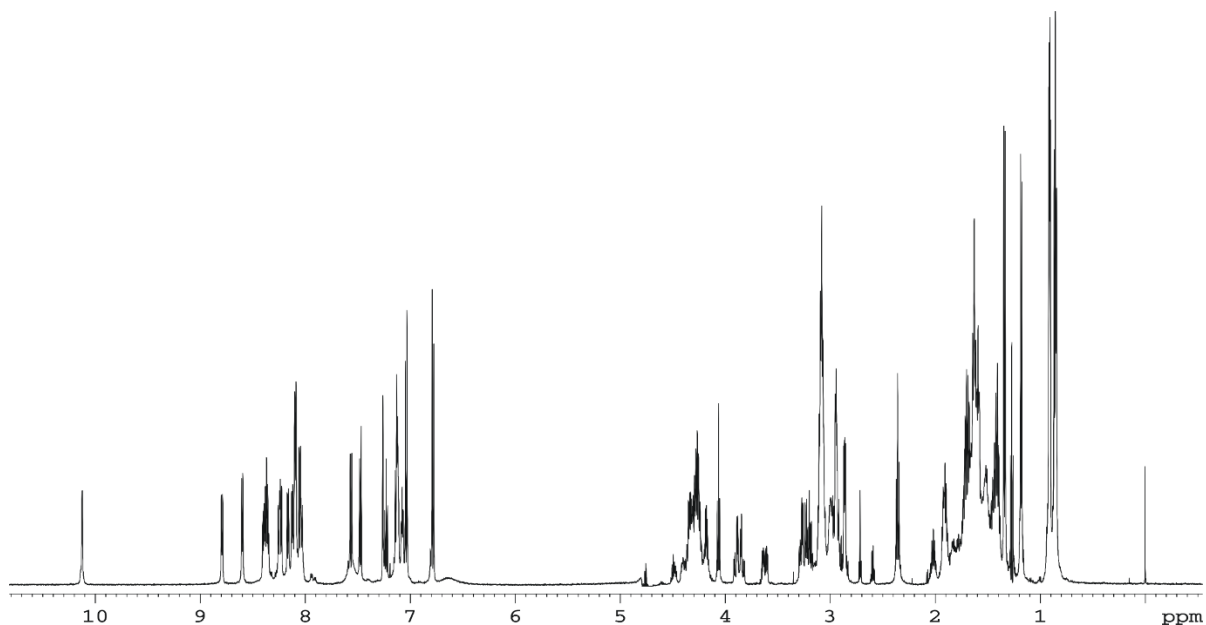
Peptid 41r



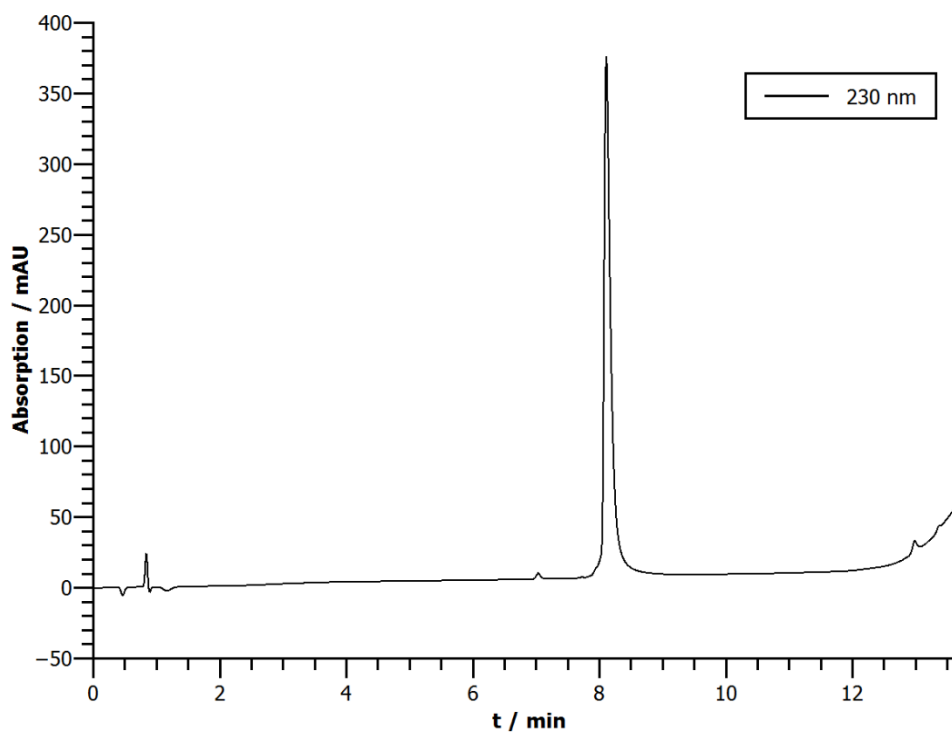
H-K-C-A-Y-E-R-T-Cit-G-R-W-R-L-L-C-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	$\delta(\alpha)$ / ppm	$\delta(\beta)$ / ppm	$\delta(\gamma)$ / ppm	$\delta(\text{sonstige})$ / ppm	$\delta(\text{NH})$ / ppm
Lys ⁰	4.06	1.90	1.44	δ : 1.70, ϵ : 3.00 $\zeta(\text{NH}_3^+)$: 7.56	-
Cys ¹	4.49	2.87	-	-	8.79
Ala ²	4.32	1.34	-	-	8.60
Tyr ³	4.61	2.94	-	aromatisch: 2,6: 7.04 3,5: 6.79	8.10
Glu ⁴	4.35	2.02, 1.90	2.36	-	8.25
Arg ⁵	4.31	1.79, 1.63	1.52	δ : 3.09, $\epsilon(\text{NH})$: 7.13	8.38
Thr ⁶	4.35	4.18	1.18	-	8.17
Cit ⁷	4.28	1.83, 1.72	1.51	δ : 3.08, $\epsilon(\text{NH})$: n/a	8.40
Gly ⁸	3.86	-	-	-	8.36
Arg ⁹	4.26	1.69, 1.61	1.41	δ : 3.06, $\epsilon(\text{NH})$: 7.07	8.10
Trp ¹⁰	4.69	3.24	-	aromatisch: 2: 7.26, 1(NH): 10.12, 4: 7.48, 7: 7.56, 5: 7.14, 6: 7.23	8.13
Arg ¹¹	4.26	1.73, 1.61	1.42	δ : 3.09 $\epsilon(\text{NH})$: 7.13	8.04
Leu ¹²	4.26	1.61	1.61	δ : 0.91, 0.86	8.10
Leu ¹³	4.39	1.62	1.62	δ : 0.91, 0.84	8.22
Cys ¹⁴	4.26	2.95	-	-	8.06



HPLC: $t_R = 8.11 \text{ min}$



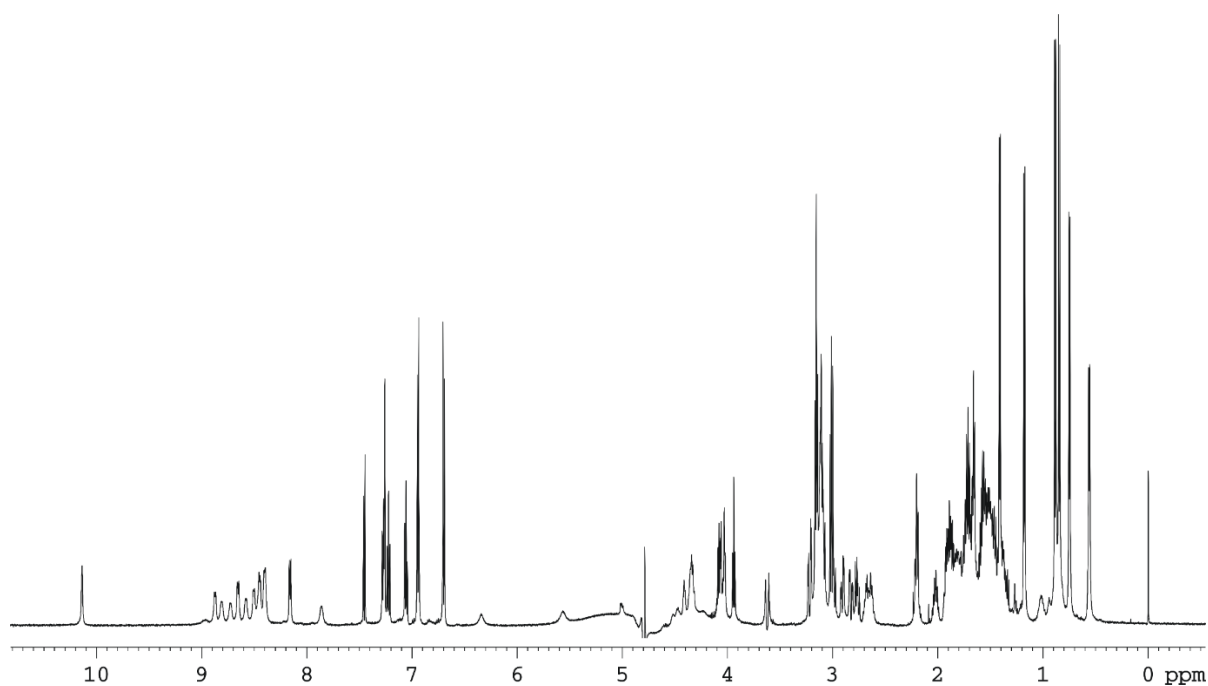
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{82}\text{H}_{134}\text{N}_{28}\text{O}_{21}\text{S}_2+3\text{H}]^{3+}$, ber.: 638.3322, gef.: 638.3310.

Peptid 41o

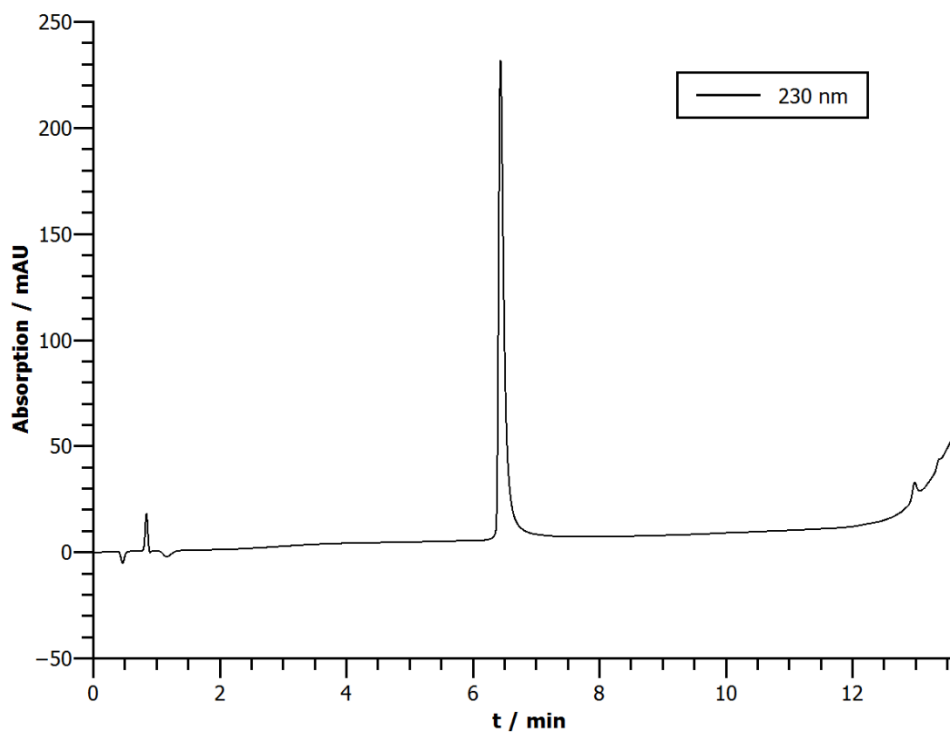


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	3.94	1.86	1.45	δ: 1.72, ε: 3.01	-
Cys ¹	5.00	3.09, 2.84	-	-	n/a
Ala ²	4.47	1.40	-	-	8.73
Tyr ³	5.00	2.89, 2.73	-	aromatisch: 2,6: 6.95 3,5: 6.70	8.40
Glu ⁴	4.62	2.02, 1.91	2.21	-	8.87
Arg ⁵	4.37	1.49, 0.85	1.03	δ: 2.66, ε(NH): n/a	8.58
Thr ⁶	4.40	4.08	1.18	-	8.40
Cit ⁷	4.04	1.91, 1.77	1.53	δ: 3.11, ε(NH): 6.34	8.97
Gly ⁸	4.05, 3.63	-	-	-	8.45
Arg ⁹	4.52	1.81, 1.72	1.52	δ: 3.16, ε(NH): n/a	7.86
Trp ¹⁰	4.89	3.11	-	aromatisch: 2: 7.26, 1(NH): 10.14, 4: 7.11, 7: 7.46, 5: 7.06, 6: 7.23	8.50
Arg ¹¹	4.61	1.84, 1.73	1.57	δ: 3.15 ε(NH): n/a	8.81
Leu ¹²	4.33	1.67	1.38	δ: 0.75, 0.56	8.45
Leu ¹³	4.58	1.67	1.59	δ: 0.90	8.65
Cys ¹⁴	4.66	3.22, 3.00	-	-	8.16



HPLC: $t_R = 6.44$ min



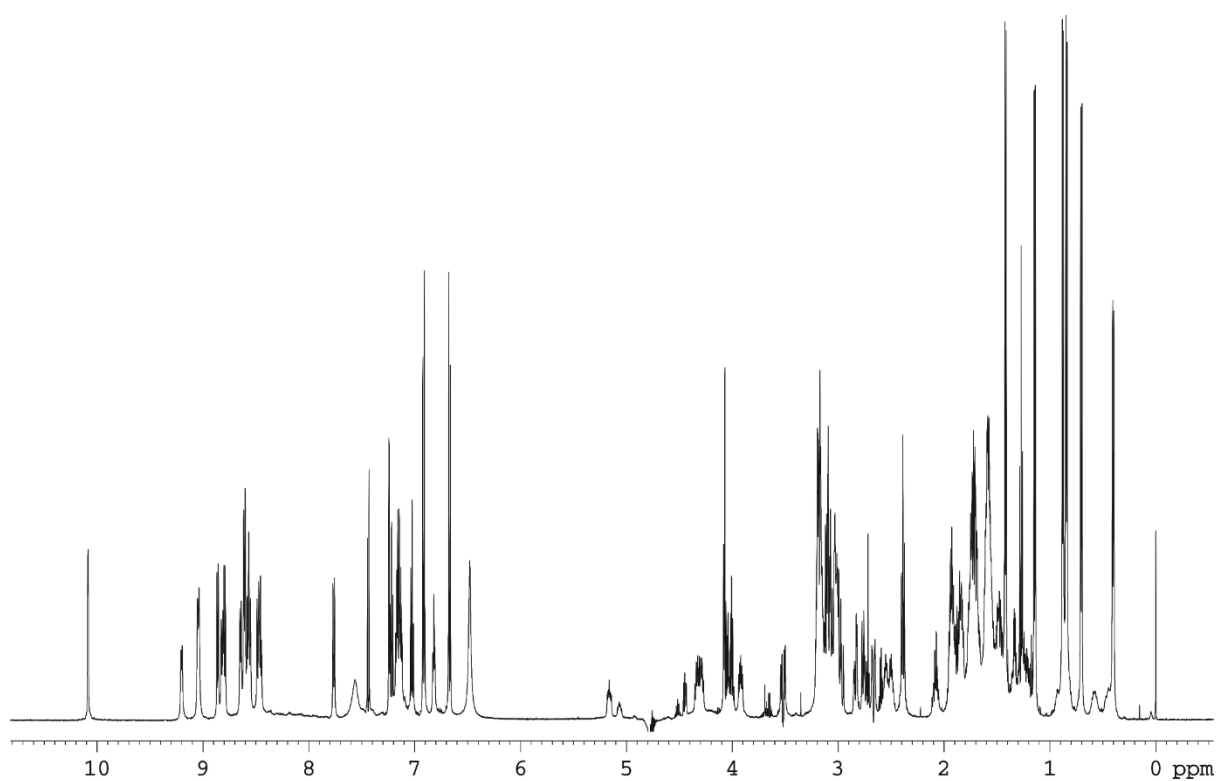
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{82}\text{H}_{132}\text{N}_{28}\text{O}_{21}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 955.9868, gef.: 955.9871.

Peptid 41o

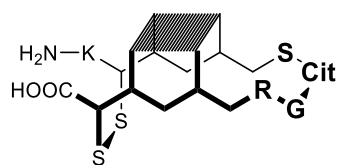


¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.08	1.93	1.45	δ: 1.72, ε: 3.01 ζ(NH ₃ ⁺): 7.56	-
Cys ¹	5.16	3.09, 2.66	-	-	8.86
Ala ²	4.51	1.40	-	-	8.80
Tyr ³	5.06	2.80	-	aromatisch: 2,6: 6.92 3,5: 6.67	8.61
Glu ⁴	4.78	2.08, 1.87	2.39	-	9.04
Arg ⁵	4.33	1.35, 0.44	0.84, 0.58	δ: 2.52, ε(NH): 6.82	8.61
Thr ⁶	4.45	4.00	1.15	-	8.55
Cit ⁷	3.92	1.92, 1.75	1.52	δ: 3.10, ε(NH): 6.48	9.20
Gly ⁸	4.06, 3.52	-	-	-	8.45
Arg ⁹	4.60	1.84, 1.75	1.56	δ: 3.18, ε(NH): 7.17	7.76
Trp ¹⁰	4.91	3.04	-	aromatisch: 2: 7.24, 1(NH): 10.09, 4: 7.15, 7: 7.44, 5: 7.03, 6: 7.22	8.65
Arg ¹¹	4.71	1.84, 1.73	1.59	δ: 3.15 ε(NH): 7.13	9.04
Leu ¹²	4.30	1.69	1.23	δ: 0.71, 0.40	8.57
Leu ¹³	4.65	1.70	1.59	δ: 0.87	8.82
Cys ¹⁴	4.83	3.18, 2.96	-	-	8.48



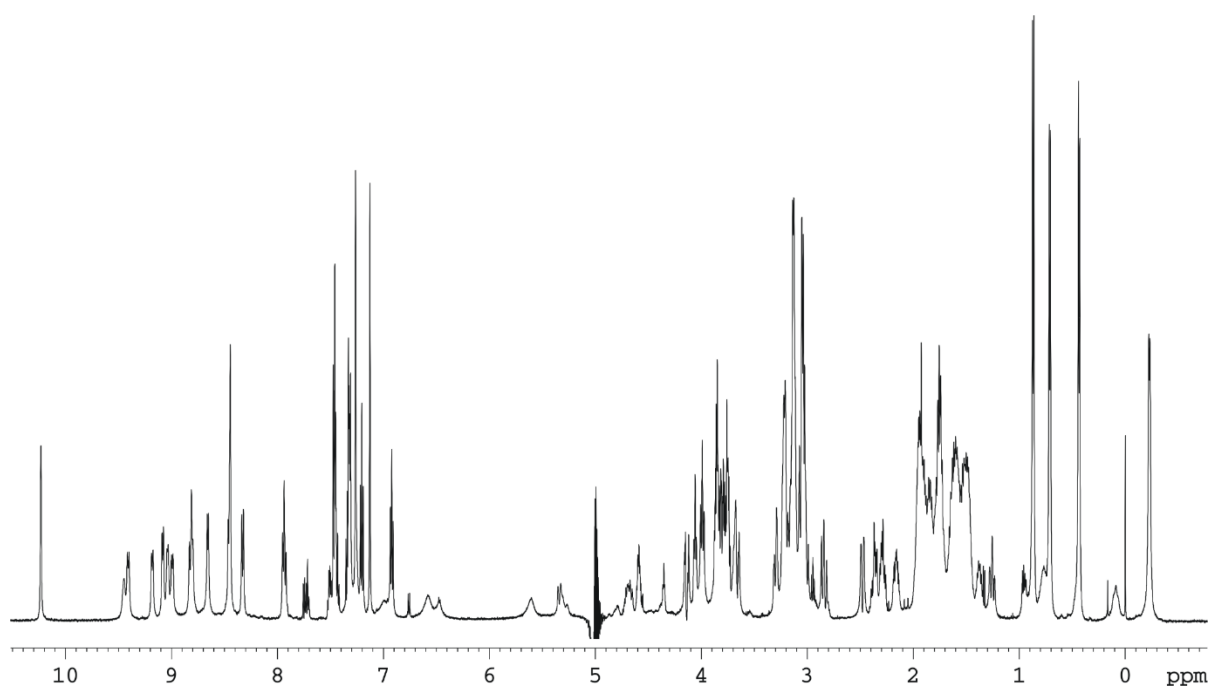
Peptid 42



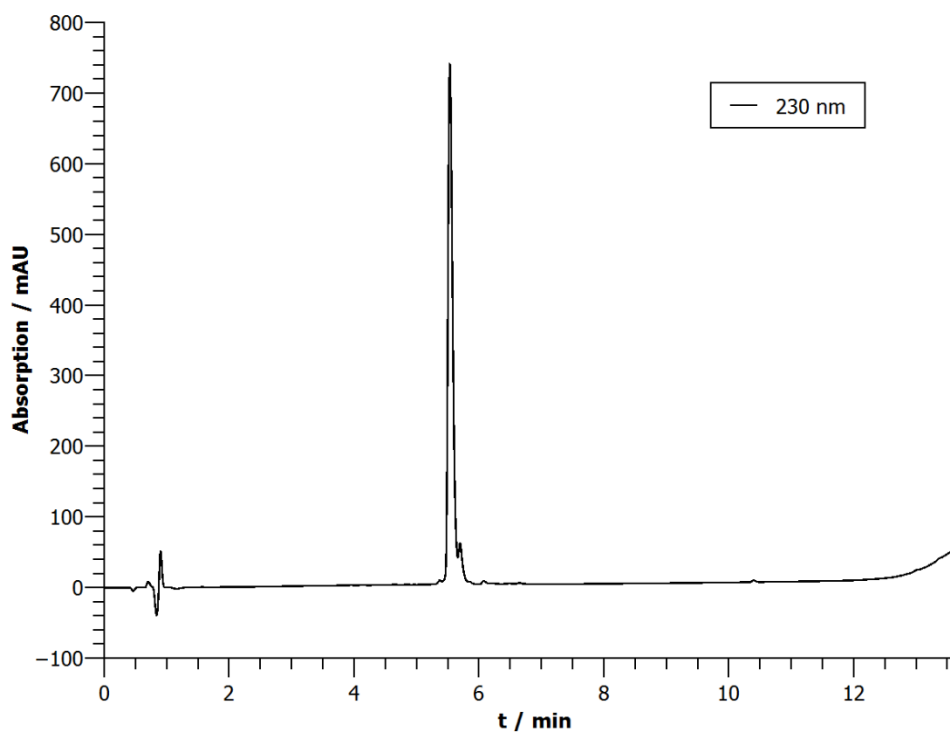
H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-S⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.06	1.94	1.51	δ: 1.75, ε: 3.05	-
Cys ¹	5.34	3.02, 2.47	-	-	n/a
His ²	4.88	3.30, 3.18	-	aromatisch: δ ² : 7.13, ε ¹ : 8.45	9.08
Trp ³	4.95	3.14, 3.04	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.24, 4: 7.33, 7: 7.47, 5: 6.92, 6: 7.21	9.04
Glu ⁴	4.81	2.17, 1.85	2.38, 2.30	-	9.41
Ser ⁵	5.27	3.79	-	-	8.99
Ser ⁶	4.60	3.83	-	-	8.66
Cit ⁷	3.99	1.59, 1.52	1.96, 1.87	δ: 3.13 ε(NH): 6.48	9.46
Gly ⁸	4.14, 3.68	-	-	-	8.66
Arg ⁹	4.73	1.86	1.63	δ: 3.21 ε(NH): 7.31	7.95
Ser ¹⁰	5.30	3.86, 3.76	-	-	8.80
Arg ¹¹	4.80	1.77	1.57, 1.48	δ: 3.16 ε(NH): 7.27	9.18
Leu ¹²	3.61	1.26, 0.09	0.79	δ: 0.44, -0.23	8.46
Val ¹³	4.00	1.36	0.87, 0.71	-	8.83
Cys ¹⁴	4.66	3.08, 2.84	-	-	8.33

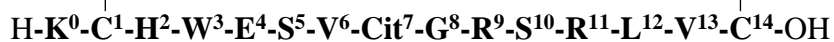
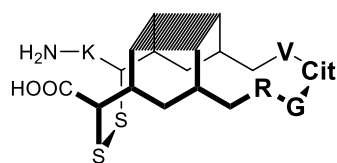


HPLC: $t_R = 5.53$ min



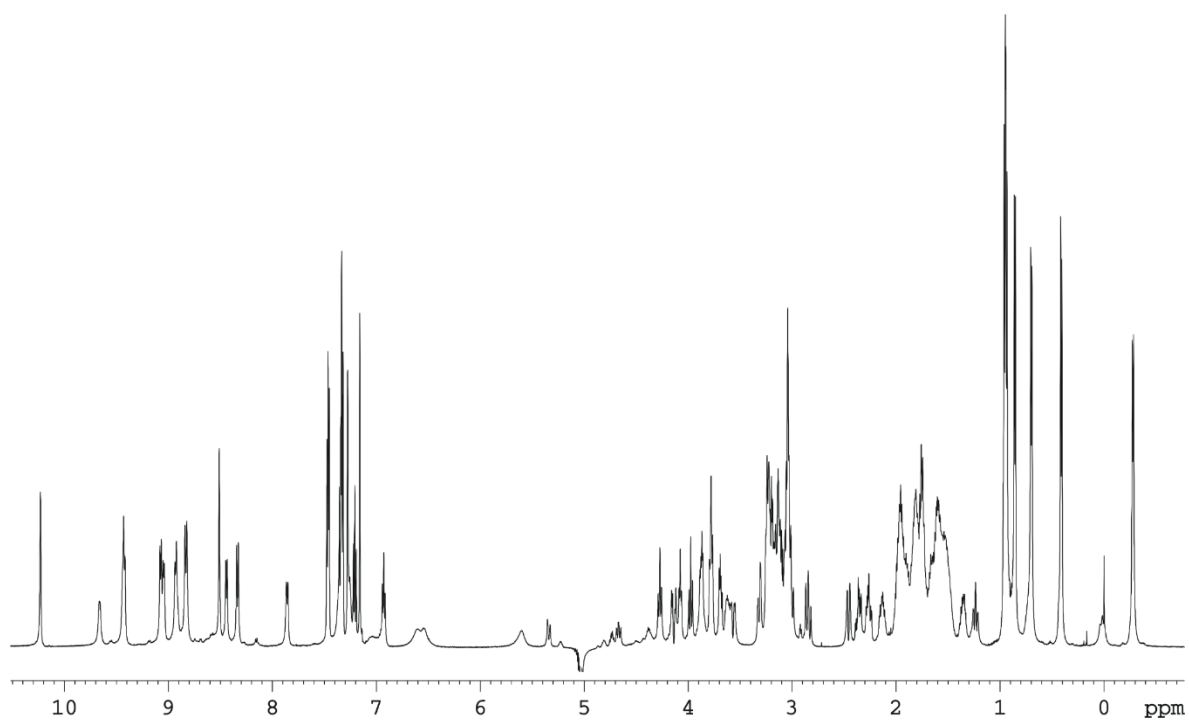
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{74}\text{H}_{119}\text{N}_{27}\text{O}_{22}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 901.9305, gef.: 901.9313.

Peptid 43

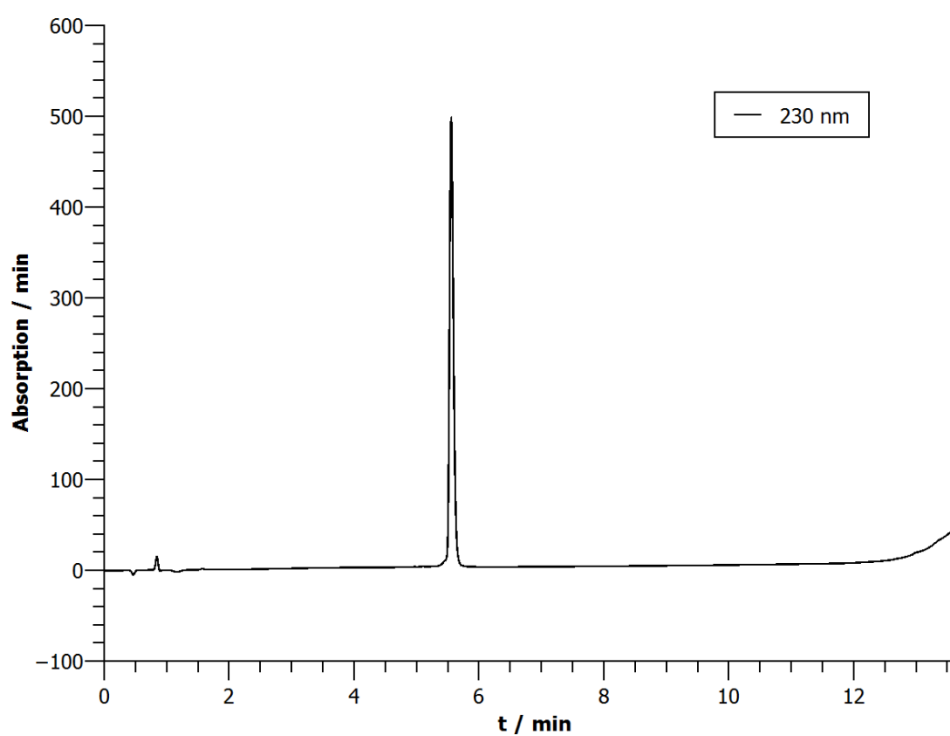


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.08	1.94	1.51	δ: 1.75, ε: 3.05	-
Cys ¹	5.35	3.02, 2.47	-	-	n/a
His ²	4.88	3.31, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 7.16, ε ¹ : 8.51	9.08
Trp ³	4.95	3. ¹⁴ , 3.04	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.23, 4: 7.34, 7: 7.47, 5: 6.93, 6: 7.21	9.04
Glu ⁴	4.81	2.13, 1.85	2.36, 2.26	-	9.42
Ser ⁵	5.01	3.79, 3.69	-	-	8.93
Val ⁶	4.27	1.98	0.95	-	8.83
Cit ⁷	3.87	1.58, 1.51	1.98, 1.81	δ: 3.21, 3.10 ε(NH): 6.54	9.66
Gly ⁸	4.14, 3.58	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.73	1.91, 1.82	1.63	δ: 3.25 ε(NH): 7.36	7.86
Ser ¹⁰	5.23	3.88, 3.78	-	-	8.91
Arg ¹¹	4.81	1.83, 1.75	1.58	δ: 3.16 ε(NH): 7.27	9.43
Leu ¹²	3.61	1.25, 0.02	0.72	δ: 0.42, -0.28	8.44
Val ¹³	3.99	1.36	0.87, 0.71	-	8.83
Cys ¹⁴	4.66	3.06, 2.83	-	-	8.33

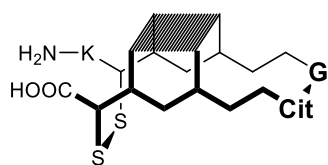


HPLC: $t_R = 5.50$ min



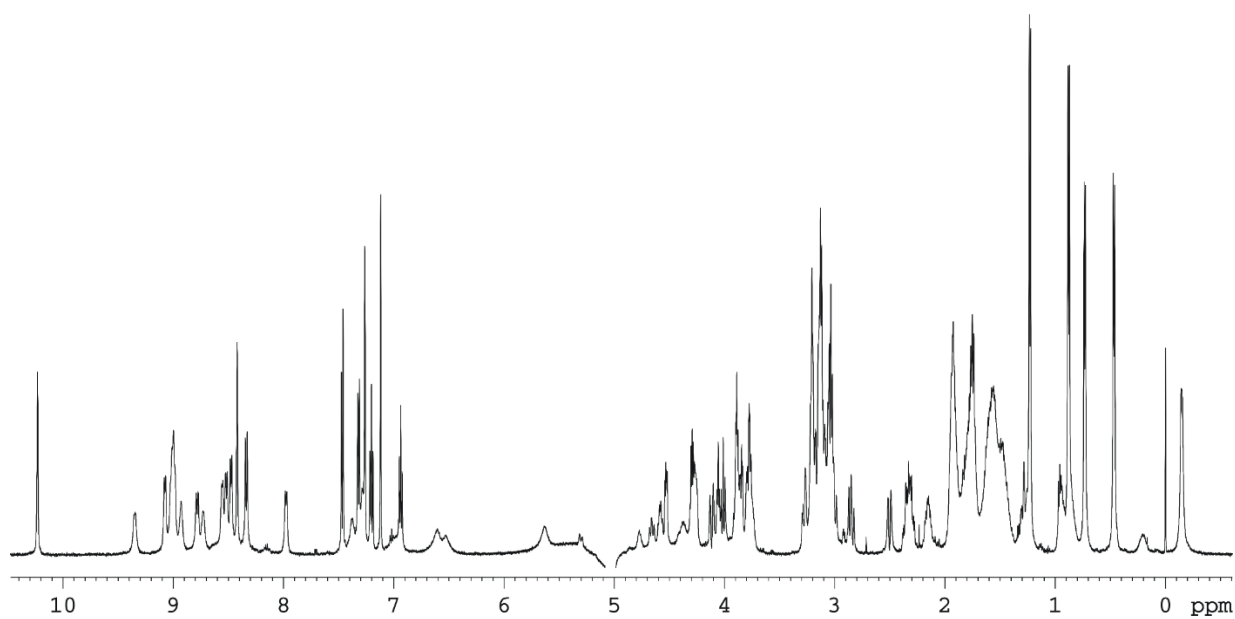
HR-MS (ESI+): für $[C_{76}H_{123}N_{27}O_{21}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 907.9487, gef.: 907.9488.

Peptid 44

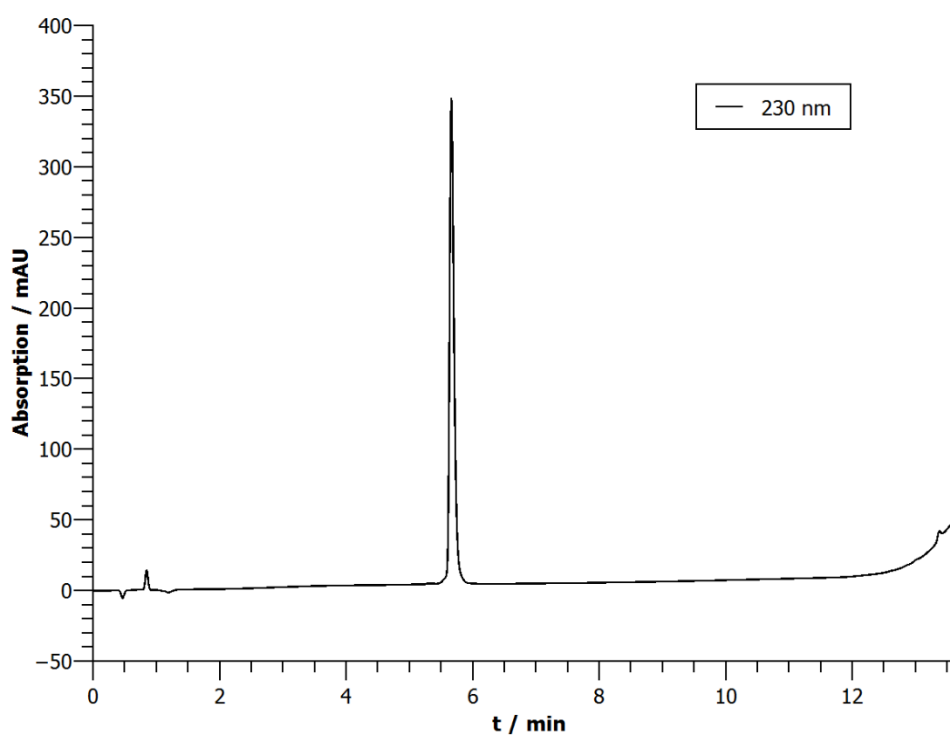


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.06	1.94	1.48	δ: 1.75, ε: 3.04	-
Cys ¹	5.29	3.01, 2.50	-	-	n/a
His ²	4.86	3.28, 3.19	-	aromatisch: δ ² : 7.12, ε ¹ : 8.43	9.08
Trp ³	4.91	3.15, 3.06	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.23, 4: 7.32, 7: 7.47, 5: 6.93, 6: 7.20	9.04
Glu ⁴	4.77	2.15, 1.90	2.33	-	9.35
Ser ⁵	5.02	3.88	-	-	9.01
Thr ⁶	4.56	4.29	1.25	-	8.52
Gly ⁷	4.12, 3.79	-	-	-	8.93
Cit ⁸	4.26	1.94, 1.78	1.59	δ: 3.13 ε(NH): 6.53	8.74
Arg ⁹	4.59	1.93, 1.83	1.61	δ: 3.21, ε(NH): 7.38	7.98
Ser ¹⁰	5.18	3.85, 3.78	-	-	8.56
Arg ¹¹	4.77	1.77	1.58, 1.48	δ: 3.12 ε(NH): 7.29	9.18
Leu ¹²	3.76	1.29, 0.22	0.85	δ: 0.47, -0.15	8.48
Val ¹³	4.01	1.43	0.88, 0.72	-	8.78
Cys ¹⁴	4.66	3.06, 2.84	-	-	8.33

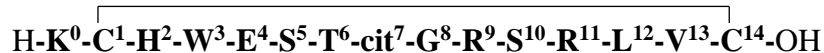
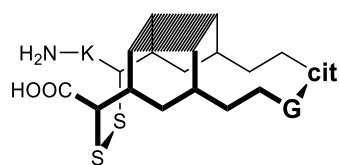


HPLC: $t_R = 5.66$ min



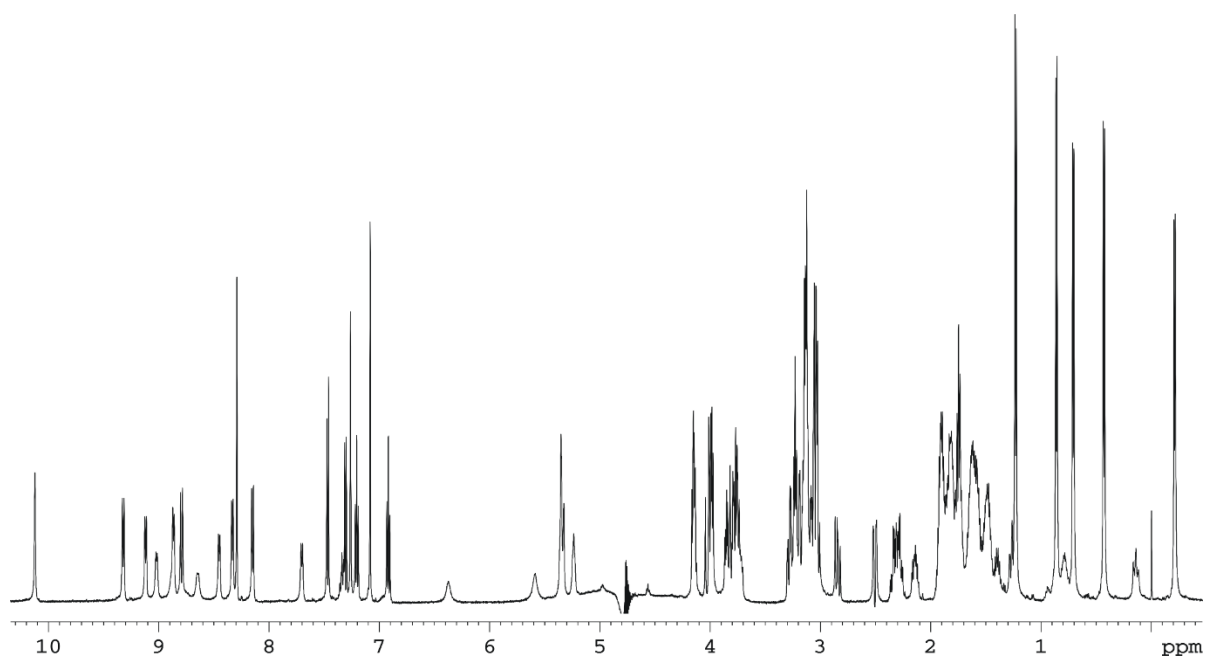
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_{22}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9402.

Peptid 45

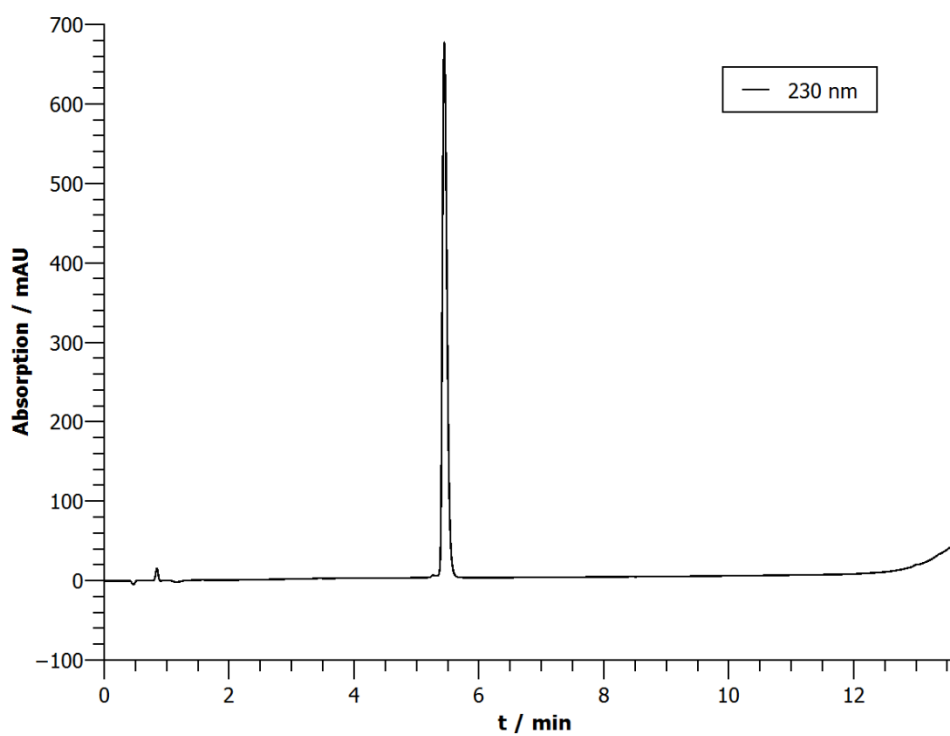


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.06	1.93	1.50	δ: 1.76, ε: 3.04	-
Cys ¹	5.36	3.04, 2.46	-	-	n/a
His ²	4.87	3.32, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 7.14, ε ¹ : 8.46	9.09
Trp ³	4.97	3.15, 3.06	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.23, 4: 7.31, 7: 7.47, 5: 6.91, 6: 7.21	9.07
Glu ⁴	4.79	2.16, 1.86	2.39, 2.30	-	9.42
Ser ⁵	5.30	3.75	-	-	9.05
Thr ⁶	4.57	4.11	1.24	-	8.57
cit ⁷	4.13	1.81	1.59	δ: 3.12 ε(NH): 6.51	9.44
Gly ⁸	4.03, 3.77	-	-	-	8.91
Arg ⁹	4.69	1.87	1.62	δ: 3.24, ε(NH): 7.33	7.75
Ser ¹⁰	5.39	3.86, 3.75	-	-	8.85
Arg ¹¹	4.80	1.77	1.58, 1.47	δ: 3.13 ε(NH): 7.26	9.24
Leu ¹²	3.67	1.24, 0.02	0.74	δ: 0.43, -0.27	8.46
Val ¹³	3.98	1.35	0.87, 0.71	-	8.85
Cys ¹⁴	4.66	3.05, 2.84	-	-	8.33

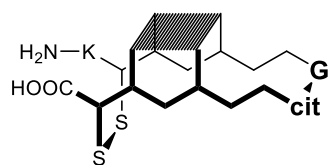


HPLC: $t_R = 5.44$ min



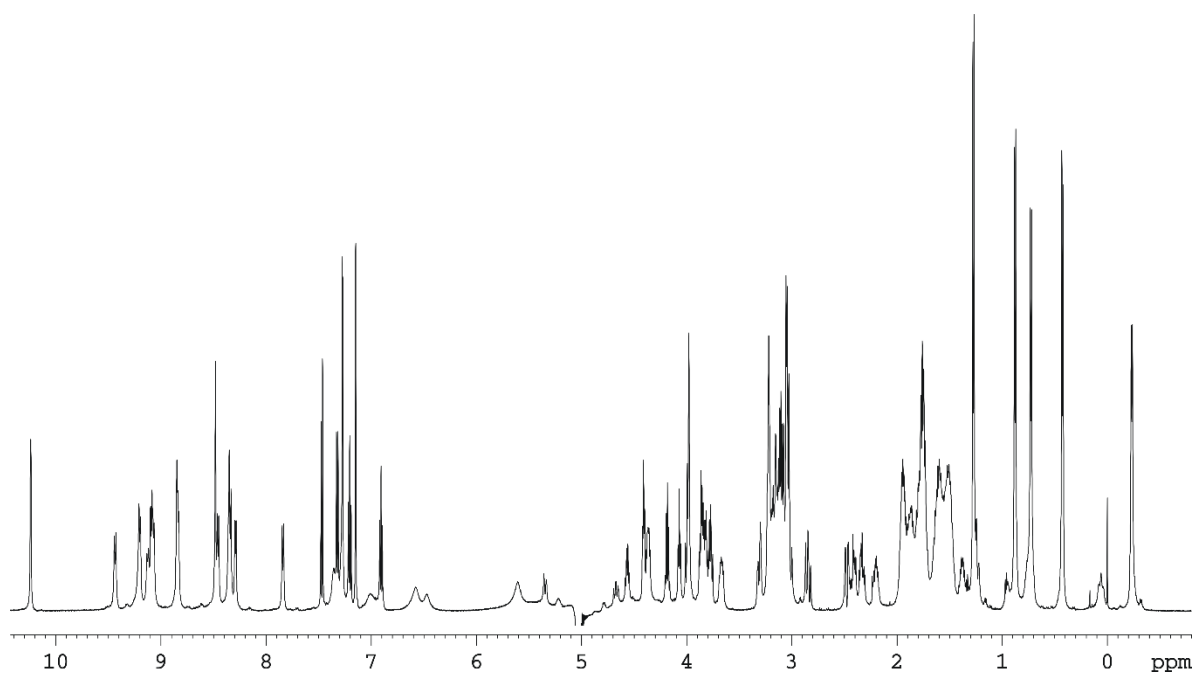
HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{121}N_{27}O_{22}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9386.

Peptid 46

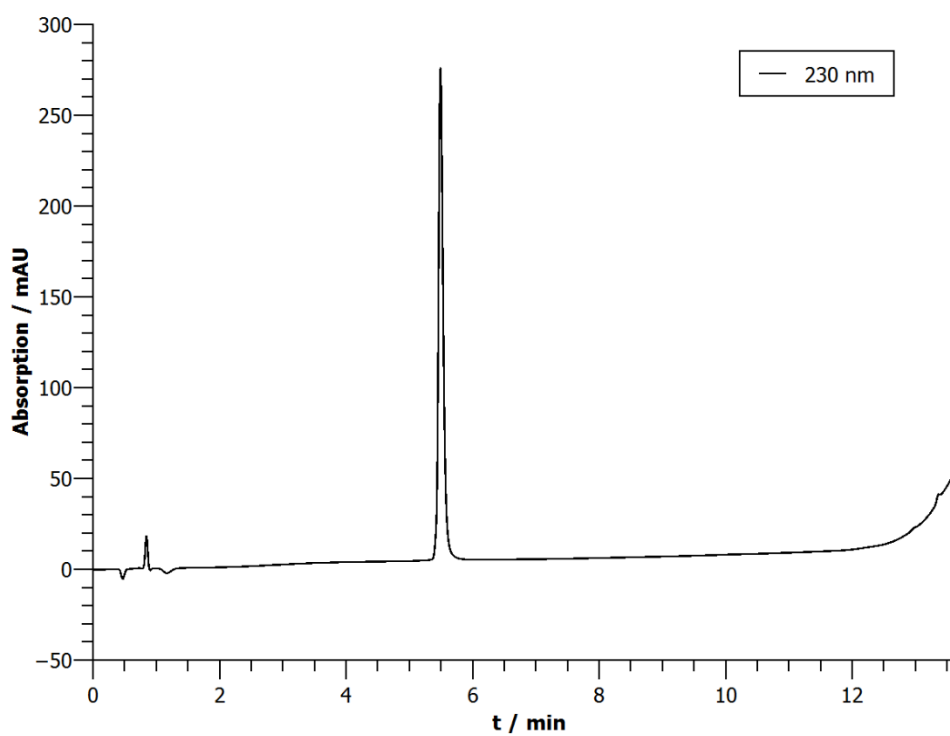


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.07	1.94	1.50	δ: 1.75, ε: 3.04	-
Cys ¹	5.35	3.01, 2.48	-	-	n/a
His ²	4.86	3.31, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 7.12, ε ¹ : 8.48	9.09
Trp ³	4.95	3.15, 3.04	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.23, 4: 7.32, 7: 7.47, 5: 6.91, 6: 7.21	9.07
Glu ⁴	4.85	2.19, 1.91	2.41, 2.31	-	9.44
Ser ⁵	5.21	3.81	-	-	9.13
Thr ⁶	4.40	4.17	1.28	-	8.29
Gly ⁷	5.00, 3.97	-	-	-	9.20
cit ⁸	4.36	1.87, 1.73	1.53	δ: 3.09, ε(NH): 6.47	8.36
Arg ⁹	4.57	1.83	1.61	δ: 3.20, ε(NH): 7.33	7.84
Ser ¹⁰	5.19	3.86, 3.76	-	-	8.84
Arg ¹¹	4.77	1.76	1.58, 1.47	δ: 3.13 ε(NH): 7.27	9.20
Leu ¹²	3.66	1.25, 0.06	0.76	δ: 0.42, -0.23	8.46
Val ¹³	3.98	1.36	0.87, 0.71	-	8.83
Cys ¹⁴	4.65	3.06, 2.85	-	-	8.34

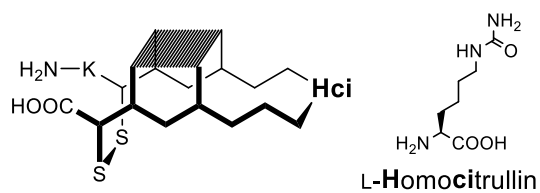


HPLC: $t_R = 5.49$ min



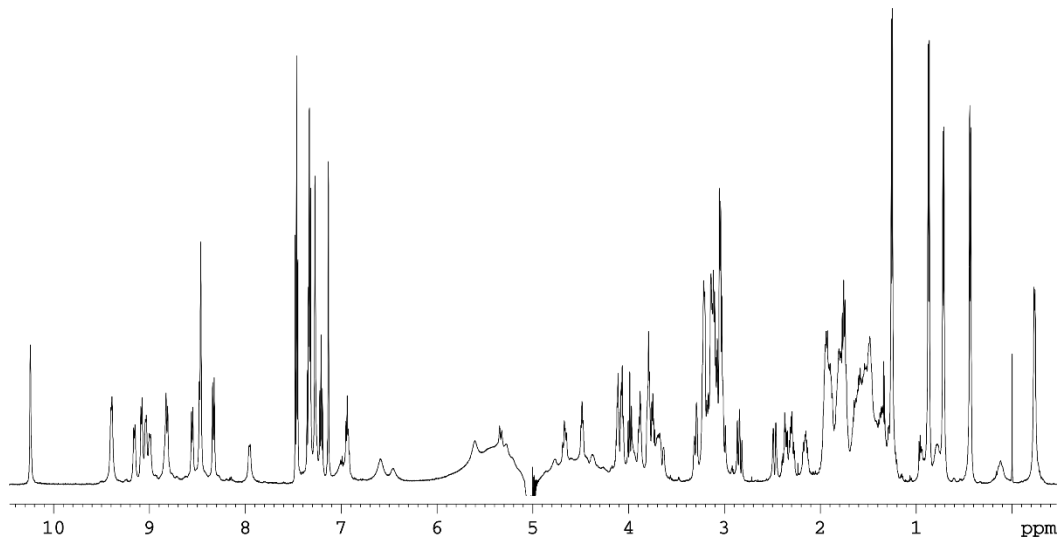
HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{121}N_{27}O_{22}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 908.9383, gef.: 908.9373.

Peptid 47

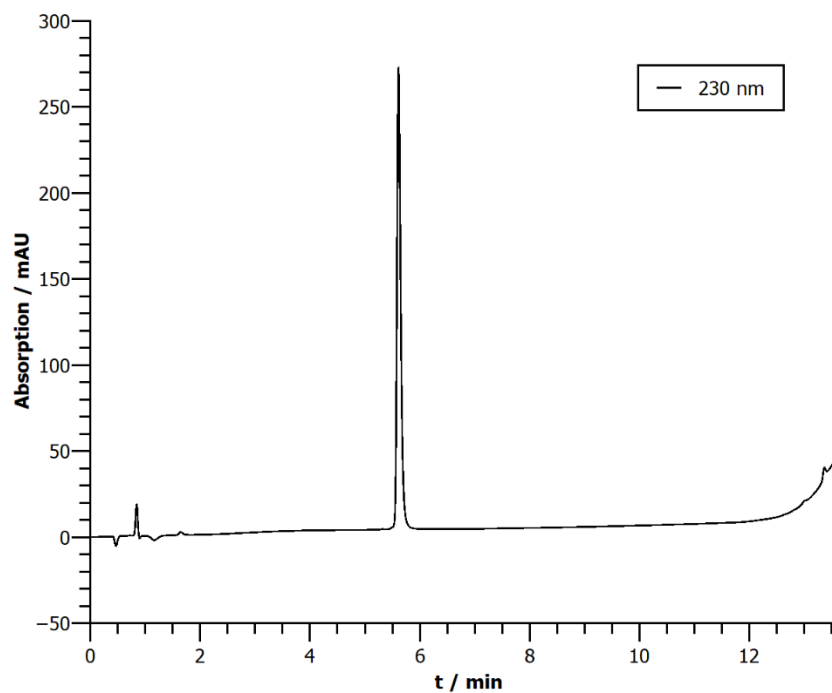


H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-Hci⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

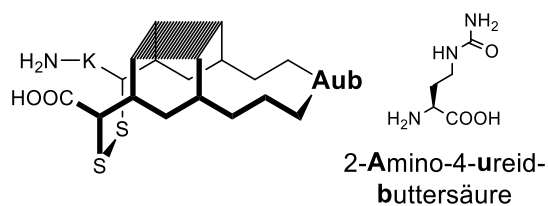


HPLC: $t_R = 5.61$ min



HR-MS (ESI+): für $[C_{76}H_{123}N_{27}O_{22}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 915.9461, gef.: 915.9456.

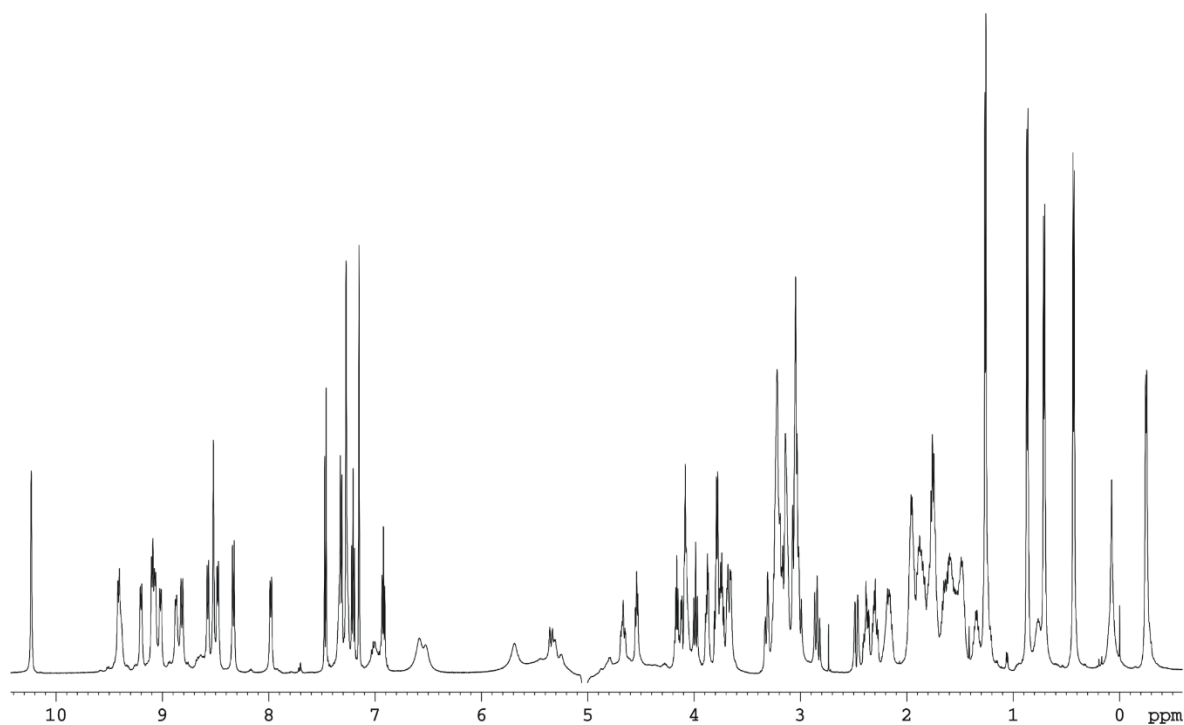
Peptid 48



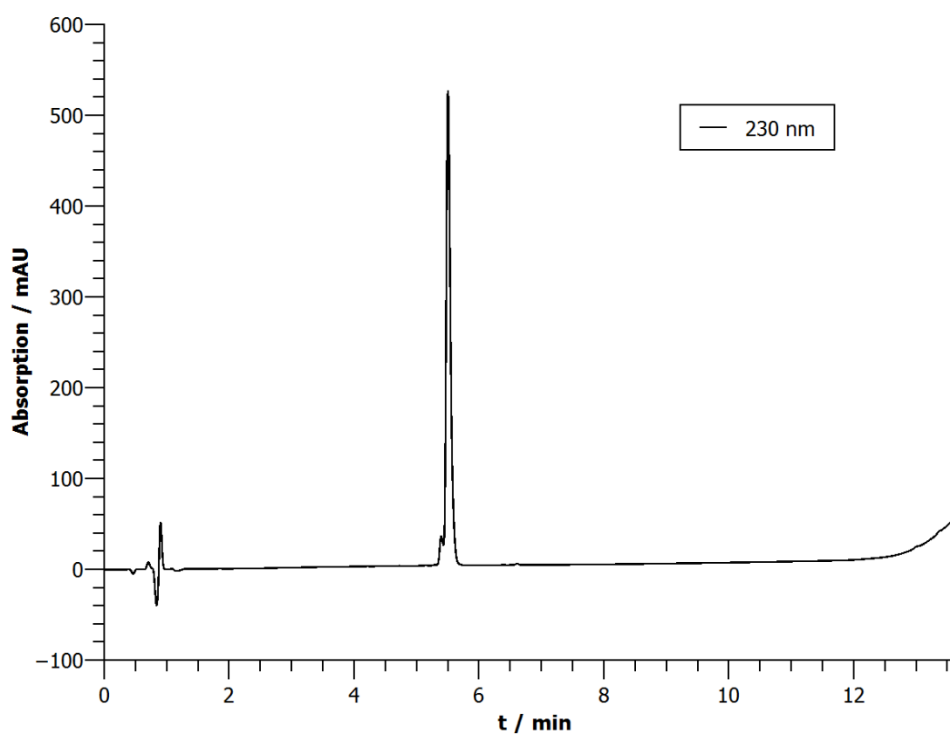
H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-Aub⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.09	1.94	1.51	δ: 1.75, ε: 3.05	-
Cys ¹	5.35	3.02, 2.47	-	-	n/a
His ²	4.88	3.31, 3.22	-	aromatisch: δ ² : 7.15, ε ¹ : 8.52	9.10
Trp ³	4.95	3.17, 3.06	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.23, 4: 7.32, 7: 7.47, 5: 6.93, 6: 7.21	9.06
Glu ⁴	4.84	2.15, 1.87	2.38, 2.31	-	9.41
Ser ⁵	5.25	3.76	-	-	9.01
Thr ⁶	4.52	4.15	1.25	-	8.57
Aub ⁷	4.11	2.19, 1.95	3.23	δ(NH): 6.51	9.38
Gly ⁸	4.11, 3.67	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.66	1.87	1.63	δ: 3.22, ε(NH): 7.34	7.98
Ser ¹⁰	5.32	3.88, 3.78	-	-	8.87
Arg ¹¹	4.77	1.74	1.58, 1.47	δ: 3.15 ε(NH): 7.27	9.18
Leu ¹²	3.67	1.25, 0.09	0.77	δ: 0.43, -0.25	8.47
Val ¹³	4.00	1.34	0.86, 0.70	-	8.82
Cys ¹⁴	4.66	3.06, 2.83	-	-	8.33

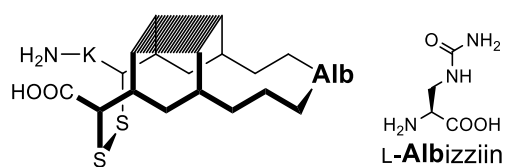


HPLC: $t_R = 5.50$ min



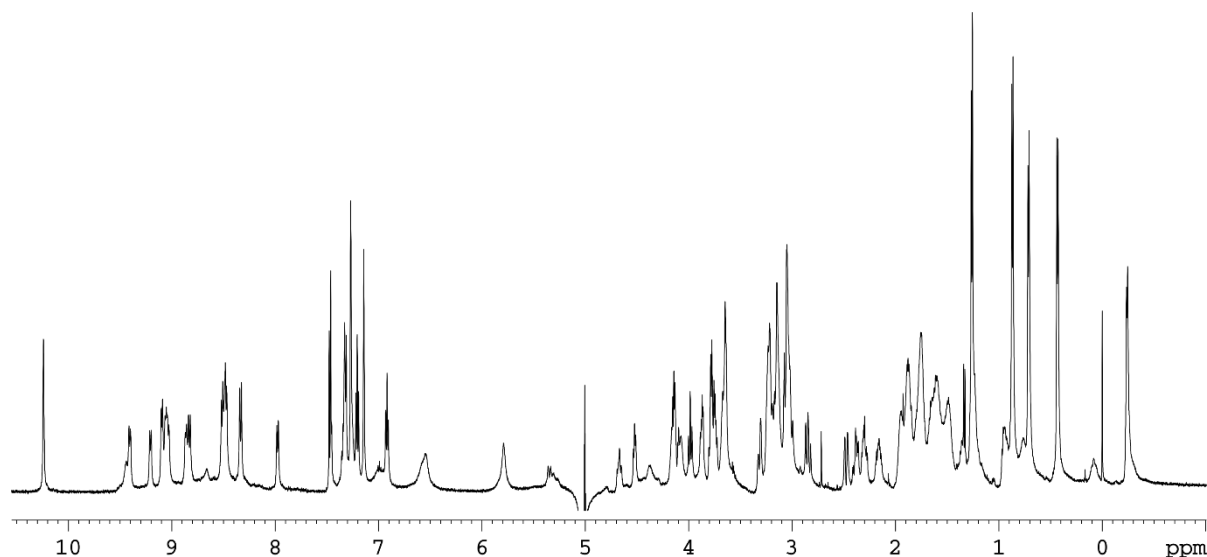
HR-MS (ESI+): für $[C_{74}H_{119}N_{27}O_{22}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 901.9305, gef.: 901.9308.

Peptid 49

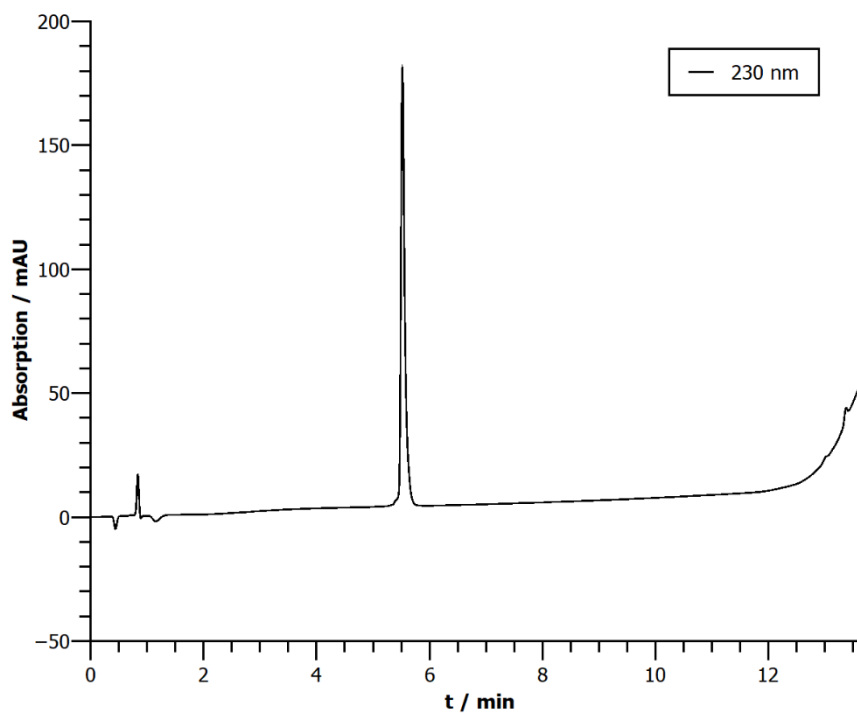


H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-Alb⁷-G⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

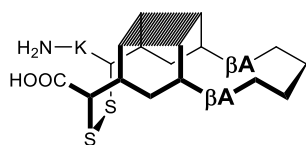


HPLC: $t_R = 5.52$ min



HR-MS (ESI⁺): für [C₇₃H₁₁₉N₂₇O₂₂S₂+2H]²⁺, ber.: 894.9227, gef.: 894.9228.

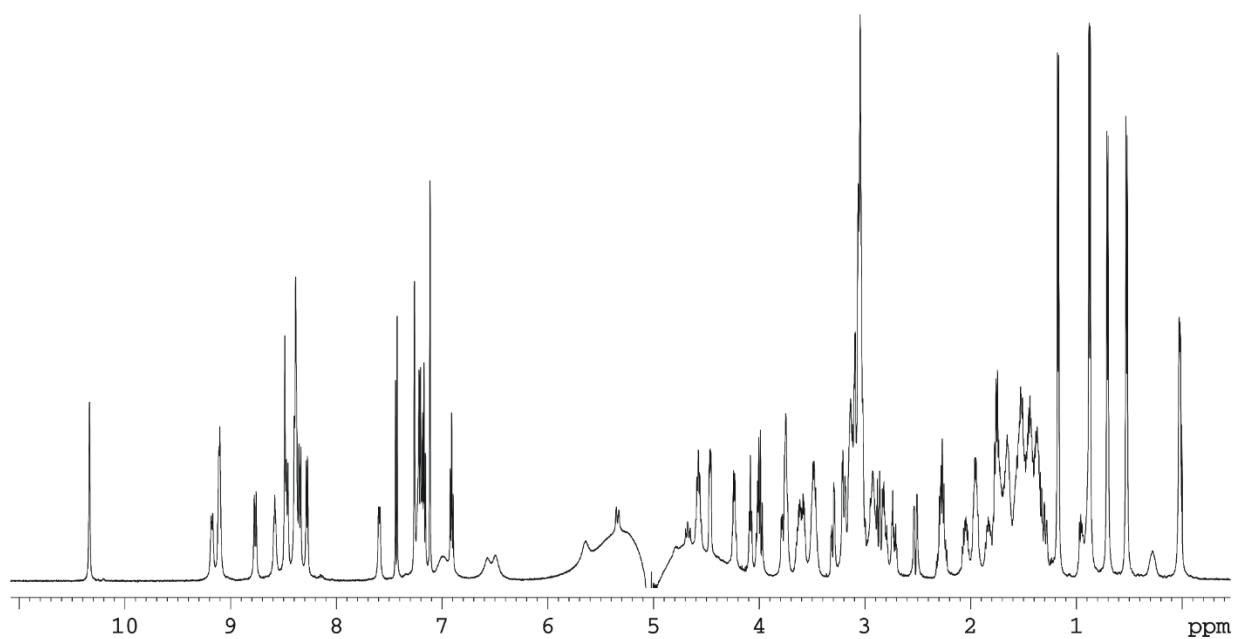
Peptid 50



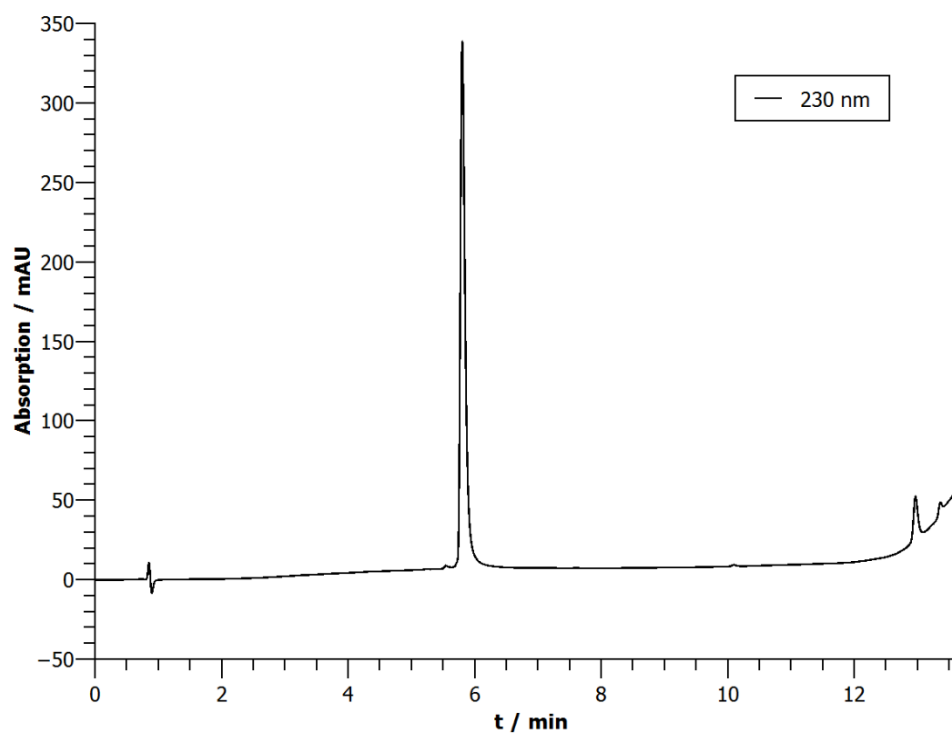
H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-βA⁵-T⁶-Cit⁷-G⁸-R⁹-βA¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.09	1.94	1.50	δ: 1.75, ε: 3.03	-
Cys ¹	5.34	3.04, 2.52	-	-	n/a
His ²	4.90	3.30, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 7.12, ε ¹ : 8.49	9.11
Trp ³	4.79	3.03	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.34, 4: 7.21, 7: 7.44, 5: 6.91, 6: 7.17	9.11
Glu ⁴	4.58	2.04, 1.83	2.27	-	9.18
β-Ala ⁵	2.94, 2.71	3.63, 3.46	-	-	8.58
Thr ⁶	4.46	4.23	1.17	-	8.28
Cit ⁷	3.75	1.68	1.43, 1.36	δ: 3.10 ε(NH): 6.49	8.38
Gly ⁸	4.76, 3.17	-	-	-	n/a
Arg ⁹	4.02	1.54	1.43, 1.36	δ: 3.05, ε(NH): 7.17	7.59
β-Ala ¹⁰	2.92, 2.81	3.28, 3.49	-	-	8.38
Arg ¹¹	4.57	1.74, 1.65	1.51, 1.44	δ: 3.13 ε(NH): 7.23	8.47
Leu ¹²	3.74	1.30, 0.29	0.90	δ: 0.53, 0.02	8.39
Val ¹³	3.98	1.39	0.87, 0.71	-	8.77
Cys ¹⁴	4.67	3.08, 2.85	-	-	8.35

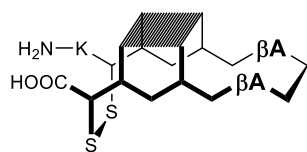


HPLC: $t_R = 5.80$ min



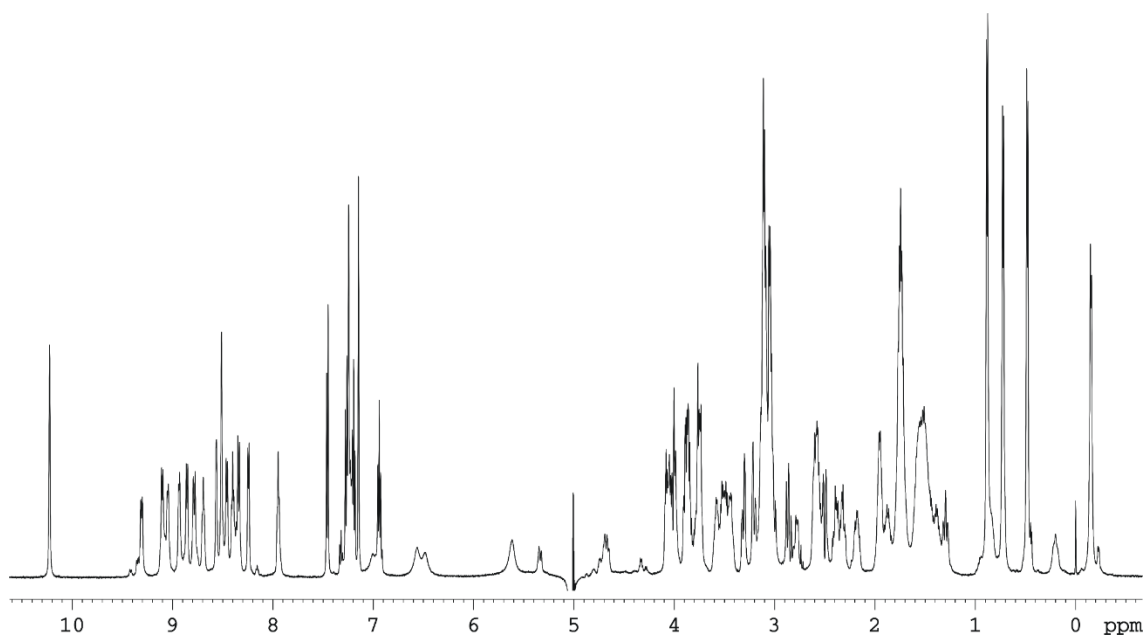
HR-MS (ESI+): für $[C_{71}H_{112}N_{24}O_{21}S_2+3H]^{3+}$, ber.: 595.6314, gef.: 595.6311.

Peptid 51

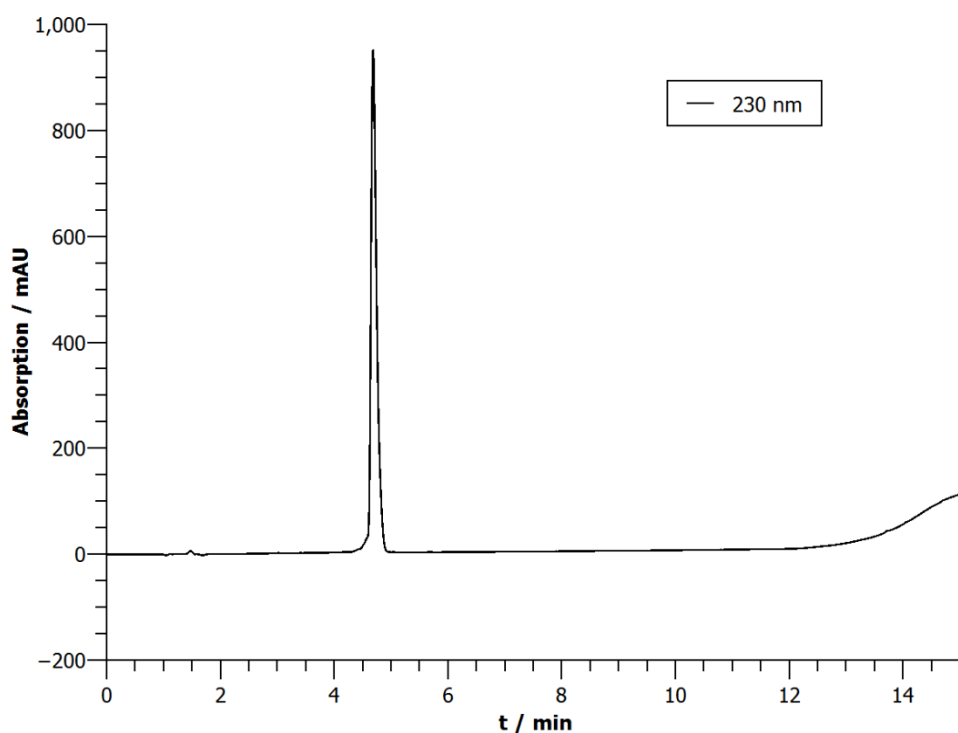


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	$\delta(\alpha)$ / ppm	$\delta(\beta)$ / ppm	$\delta(\gamma)$ / ppm	$\delta(\text{sonstige})$ / ppm	$\delta(\text{NH})$ / ppm
Lys ⁰	4.09	1.97	1.50	δ : 1.76, ϵ : 3.04	-
Cys ¹	5.34	3.02, 2.50	-	-	n/a
His ²	4.87	3.32, 3.21	-	aromatisch: δ^2 : 7.15, ϵ^1 : 8.51	9.10
Trp ³	4.93	3.09	-	aromatisch: 2: 7.25, 1(NH): 10.23, 4: 7.27, 7: 7.46, 5: 6.94, 6: 7.20	9.05
Glu ⁴	4.82	2.18, 1.87	2.35	-	9.31
Ser ⁵	4.70	3.87	-	-	8.94
β -Ala ⁶	2.80, 2.60	3.58, 3.43	-	-	7.95
Cit ⁷	4.06	1.74	1.52	δ : 3.11 $\epsilon(\text{NH})$: 6.48	8.56
Gly ⁸	4.02, 3.75	-	-	-	8.70
β -Ala ⁹	2.58	3.52	-	-	8.40
Ser ¹⁰	5.02	3.91, 3.75	-	-	8.25
Arg ¹¹	4.75	1.76	1.59, 1.44	δ : 3.13 $\epsilon(\text{NH})$: 7.23	8.86
Leu ¹²	3.75	1.30, 0.21	0.85	δ : 0.49, -0.15	8.46
Val ¹³	4.00	1.38	0.89, 0.73	-	8.79
Cys ¹⁴	4.68	3.07, 2.87	-	-	8.34

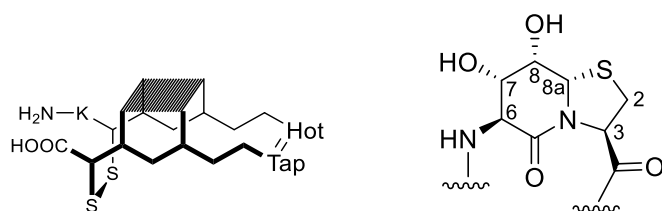


HPLC: $t_R = 4.68$ min (Säule: ACE 3 C18, 150 x 3.0 mm, Gradient: 15-30% B in 10 min
Flussrate: 0.60 mL/min)



HR-MS (ESI+): für $[C_{71}H_{112}N_{24}O_{21}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 851.4010, gef.: 851.4016.

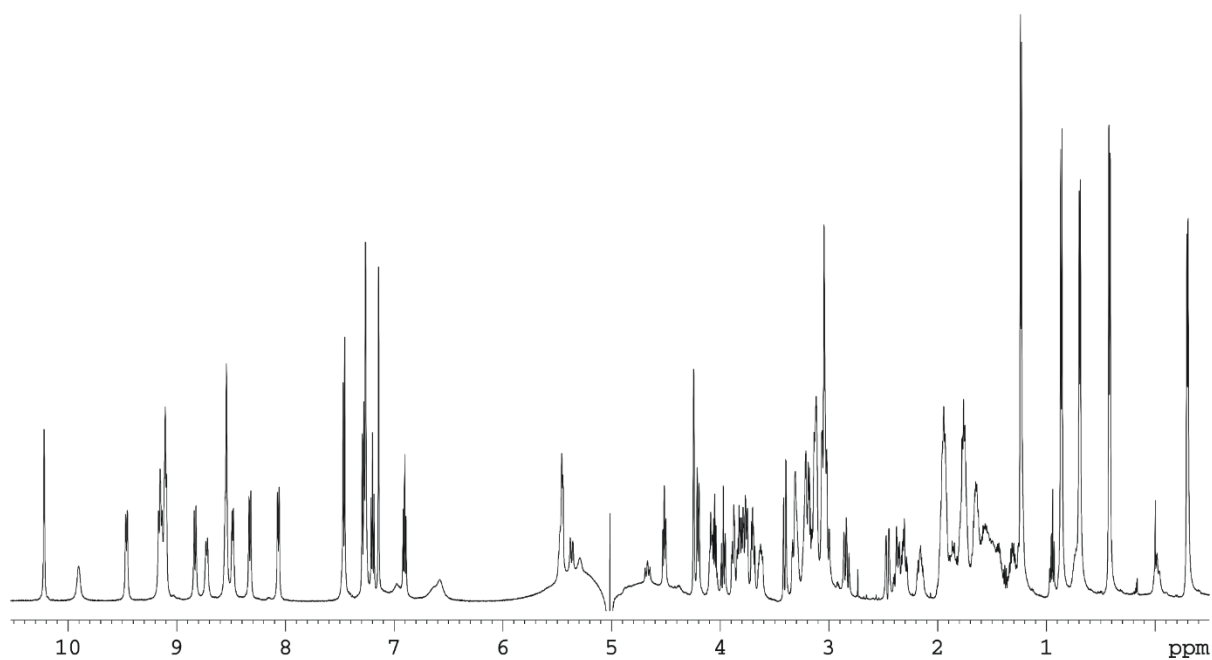
Peptid 54



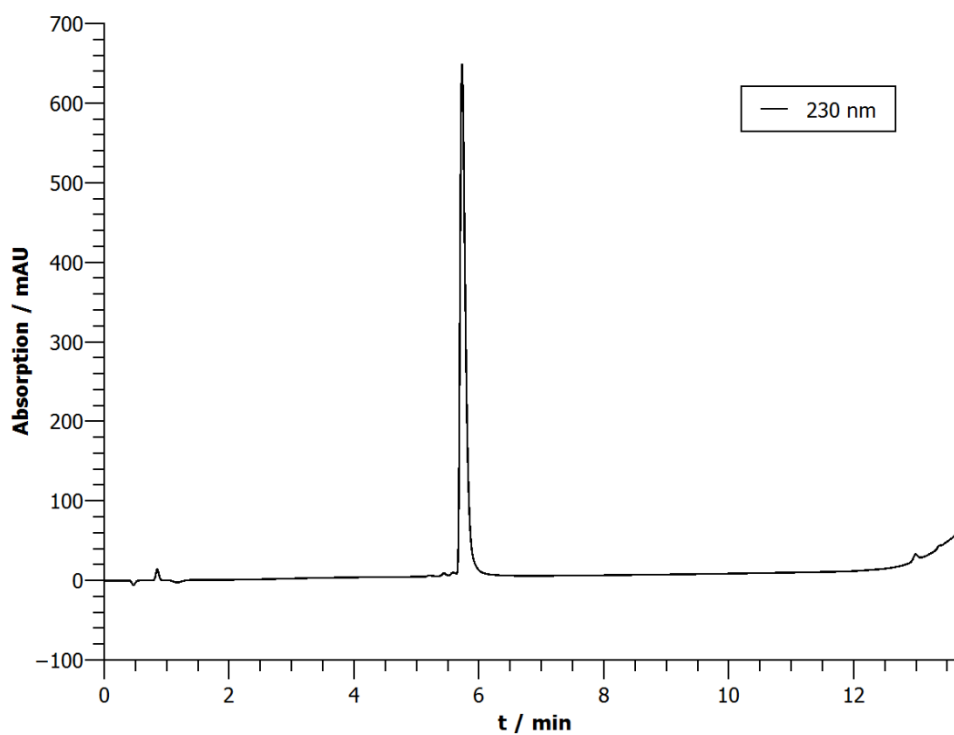
H-K⁰-C¹-H²-W³-E⁴-S⁵-T⁶-Hot⁷=Tap⁸-R⁹-S¹⁰-R¹¹-L¹²-V¹³-C¹⁴-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.09	1.96	1.51	δ: 1.76, ε: 3.03 ζ(NH ₃ ⁺): 7.56	-
Cys ¹	5.37	3.01, 2.46	-	-	n/a
His ²	4.88	3.32, 3.20	-	aromatisch: δ ² : 7.14, ε ¹ : 8.54	9.10
Trp ³	4.92	3.13, 3.04	-	aromatisch: 2: 7.26, 1(NH): 10.22, 4: 7.29, 7: 7.46, 5: 6.90, 6: 7.20	9.11
Glu ⁴	4.87	2.16, 1.86	2.38, 2.31	-	9.46
Ser ⁵	5.28	3.89, 3.78	-	-	9.15
Thr ⁶	4.53	4.04	1.24	-	8.55
Hot ⁷	-	-	-	6: 3.76 7,8: 4.21 8a: 5.02	9.91
Tap ⁸	-	-	-	3: 5.46 2: 3.41, 3.18	-
Arg ⁹	4.84	1.93	1.64	δ: 3.31, 3.22 ε(NH): 7.46	8.07
Ser ¹⁰	5.474	3.82, 3.71	-	-	8.72
Arg ¹¹	4.87	1.77	1.57, 1.43	δ: 3.13 ε(NH): 7.26	9.14
Leu ¹²	3.63	1.22, -0.01	0.74	δ: 0.42, -0.30	8.48
Val ¹³	3.96	1.30	0.87, 0.70	-	8.83
Cys ¹⁴	4.66	3.06, 2.83	-	-	8.33

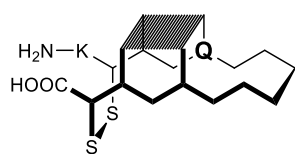


HPLC: $t_R = 5.72$ min



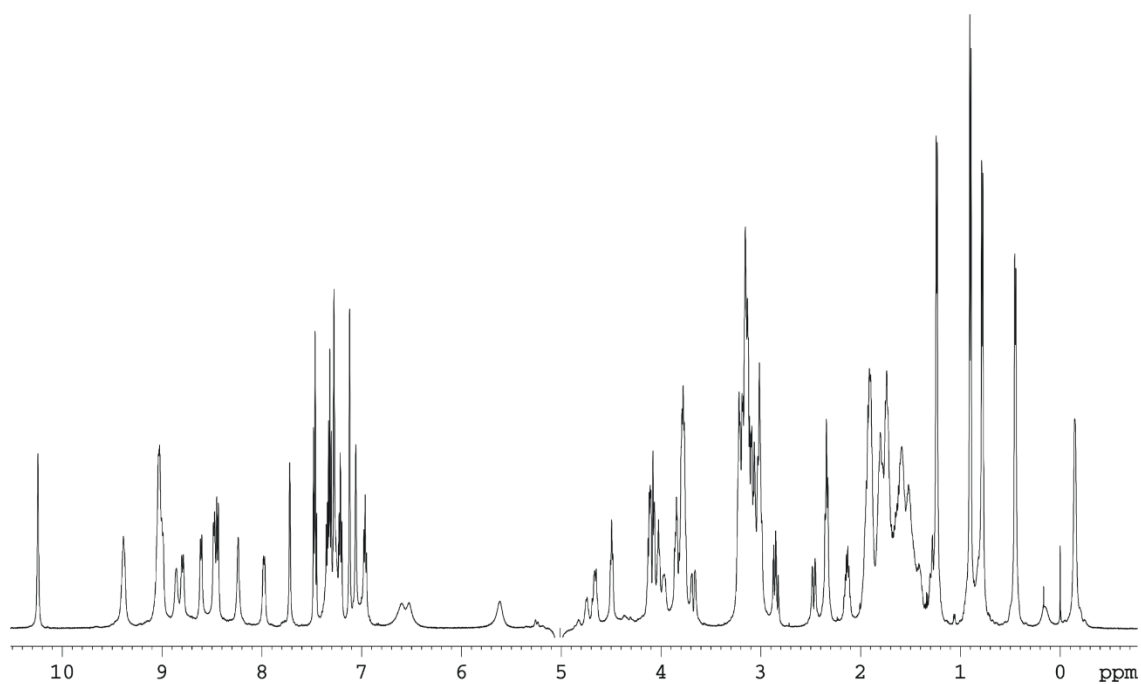
HR-MS (ESI+): für $[C_{75}H_{117}N_{25}O_{23}S_3+2H]^{2+}$, ber.: 916.9031, gef.: 916.9019.

Peptid 55

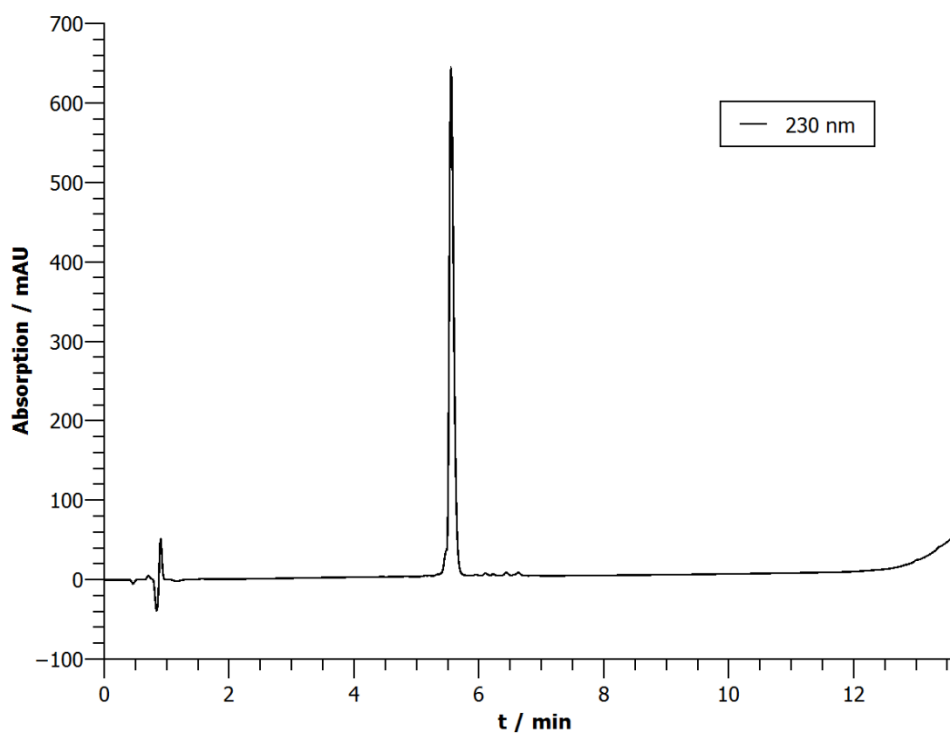


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.03	1.90	1.44	δ: 1.75, ε: 3.01	-
Cys ¹	5.26	3.00, 2.47	-	-	n/a
His ²	5.00	3.16	-	aromatisch: δ ² : 7.12, ε1: 8.24	9.03
Trp ³	4.84	3.16	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.24, 4: 7.33, 7: 7.47, 5: 6.97, 6: 7.22	9.02
Gln ⁴	4.81	2.13, 1.91	2.34	ε(NH): 7.72, 7.06	9.41
Ser ⁵	5.12	3.79	-	-	9.05
Thr ⁶	4.49	4.11	1.24	-	8.61
Cit ⁷	3.98	1.54	1.80	δ: 3. ¹⁴ ε(NH): 6.53	9.66
Gly ⁸	4. ¹⁴ , 3.68	-	-	-	8.66
Arg ⁹	4.65	1.90, 1.81	1.62	δ: 3.22 ε(NH): 7.35	7.98
Ser ¹⁰	5.18	3.80	-	-	8.80
Arg ¹¹	4.74	1.76	1.55	δ: 3.16 ε(NH): 7.26	8.99
Leu ¹²	3.77	1.27, 0.15	0.83	δ: 0.44, -0.15	8.48
Val ¹³	4.09	1.70	0.89, 0.78	-	8.80
Cys ¹⁴	4.66	3.08, 2.84	-	-	8.44

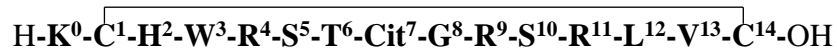
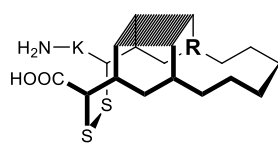


HPLC: $t_R = 5.55$ min



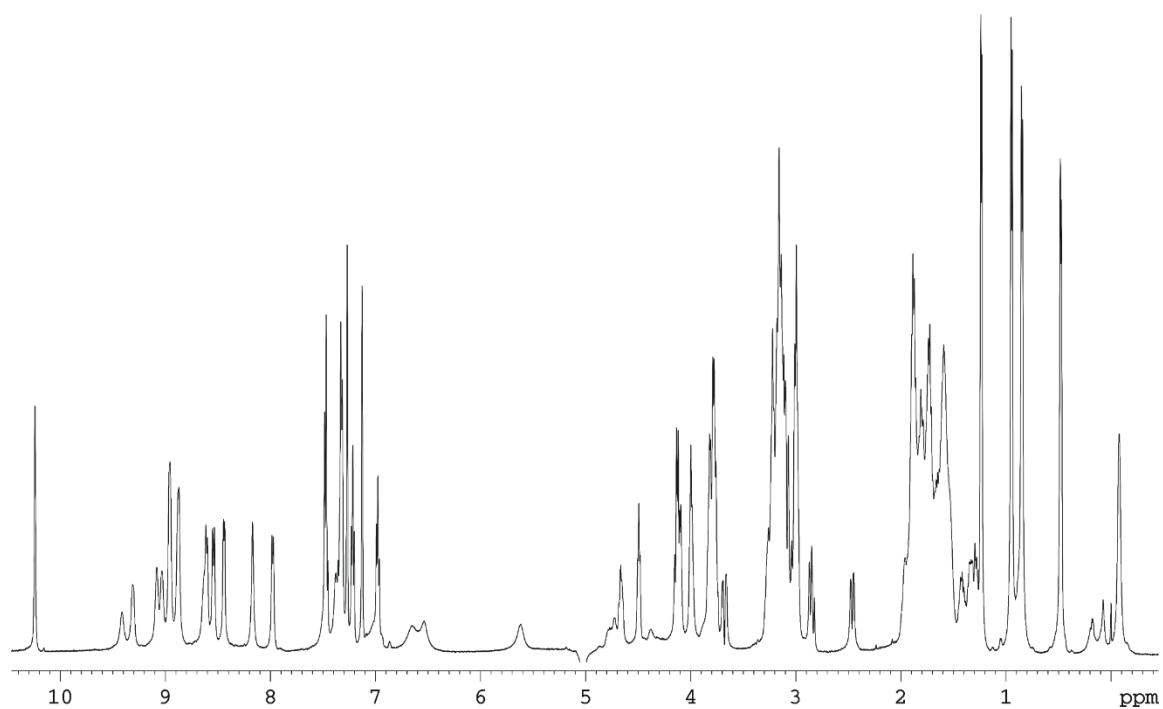
HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{75}\text{H}_{122}\text{N}_{28}\text{O}_{21}\text{S}_2 + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 908.4475, gef.: 908.4472.

Peptid 56

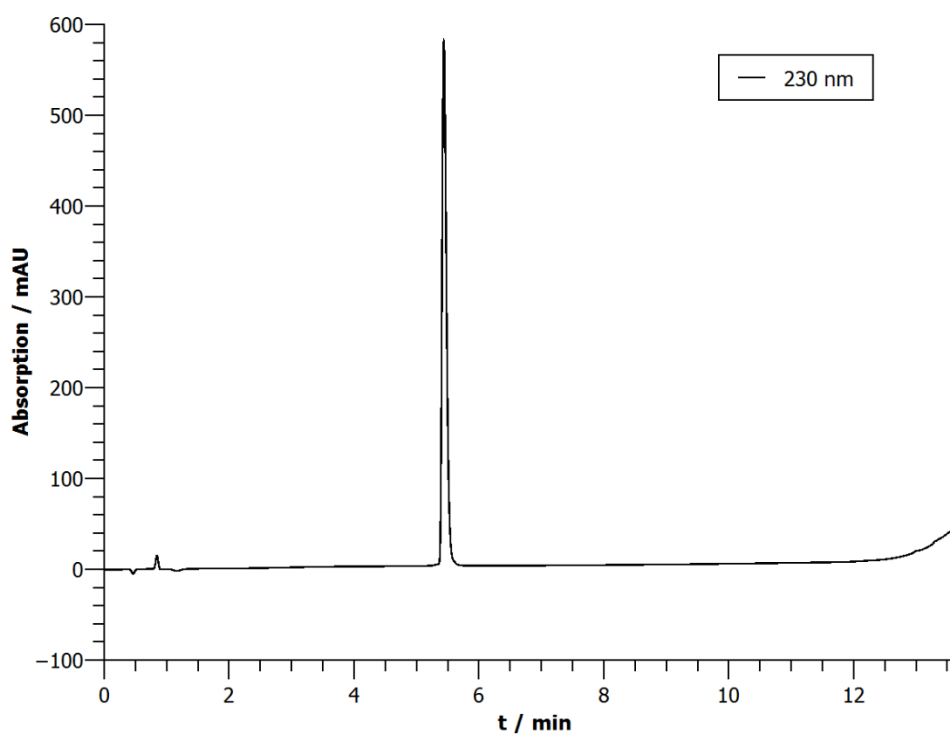


¹H-NMR: 600 MHz, 280 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1).

Aminosäure	δ(α) / ppm	δ(β) / ppm	δ(γ) / ppm	δ(sonstige) / ppm	δ(NH) / ppm
Lys ⁰	4.03	1.91	1.44	δ: 1.75, ε: 3.02	-
Cys ¹	5.26	3.02, 2.47	-	-	n/a
His ²	5.00	3.17, 3.00	-	aromatisch: δ ² : 7.13, ε1: 8.17	8.96
Trp ³	4.86	3.11	-	aromatisch: 2: 7.27, 1(NH): 10.24, 4: 7.33, 7: 7.48, 5: 6.98, 6: 7.22	9.08
Arg ⁴	4.77	1.87, 1.76	1.57	δ: 3.26, 3.18 ε(NH): n/a	9.35
Ser ⁵	5.12	3.77	-	-	9.03
Thr ⁶	4.49	4.11	1.24	-	8.61
Cit ⁷	4.00	1.97, 1.80	1.55	δ: 3.15 ε(NH): 6.54	9.42
Gly ⁸	4.11, 3.68	-	-	-	8.63
Arg ⁹	4.65	1.90, 1.84	1.63	δ: 3.23 ε(NH): 7.38	7.98
Ser ¹⁰	5.10	3.78	-	-	8.87
Arg ¹¹	4.73	1.78	1.57	δ: 3.15 ε(NH): 7.33	8.95
Leu ¹²	3.82	1.31, 0.19	0.87	δ: 0.47, -0.07	8.44
Val ¹³	4.11	1.89	0.95, 0.85	-	8.87
Cys ¹⁴	4.66	3.09, 2.85	-	-	8.54



HPLC: $t_R = 5.43$ min

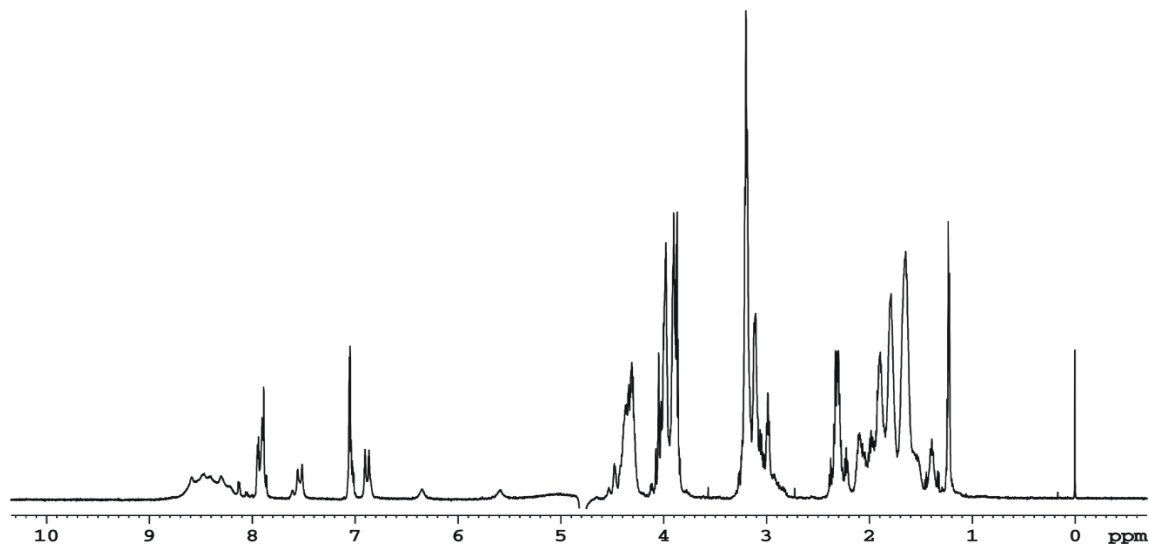


HR-MS (ESI+): für $[C_{76}H_{126}N_{30}O_{20}S_2+2H]^{2+}$, ber.: 922.4647, gef.: 922.4671.

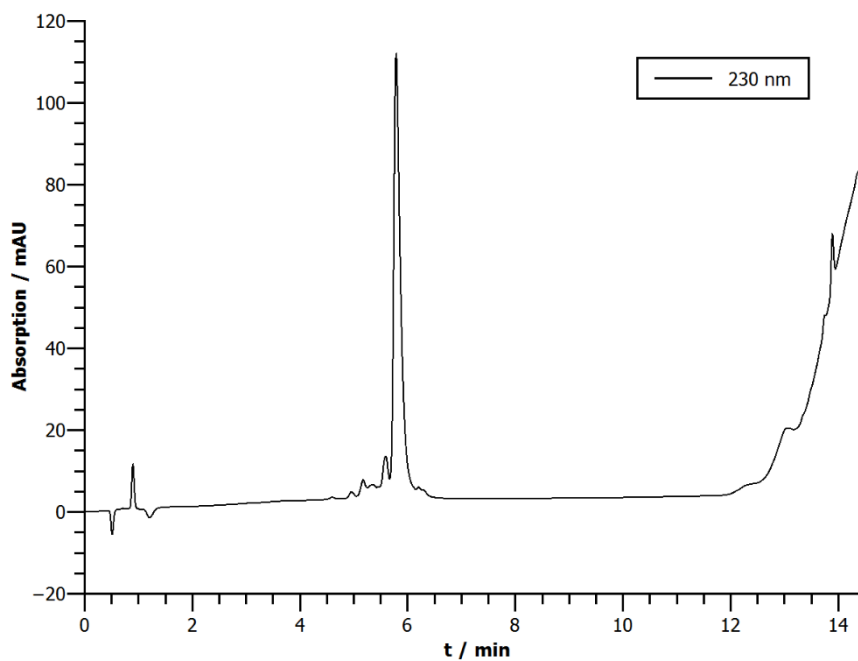
cfc1-cyc

H-K-H-Q-C-H-Q-E-S-T-Cit-G-R-S-R-G-R-C-G-R-S-G-S-OH

¹H-NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.0)/D₂O 9:1.



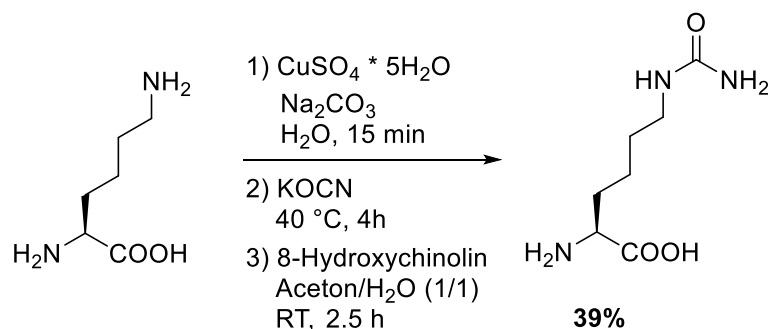
HPLC: $t_R = 5.78$ min



HR-MS (ESI+): für $[C_{93}H_{157}N_{43}O_{33}S_2+3H]^{3+}$, ber.: 824.0538, gef.: 825.0526.

6.6 Synthese der Aminosäurebausteine

6.6.1 Darstellung von H-L-Hci-OH (AS2)

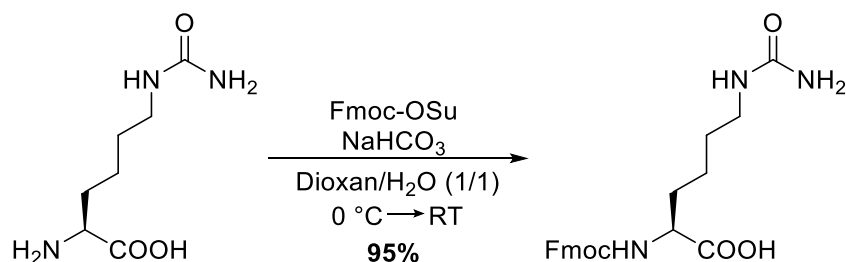


L-Lysin-Hydrochlorid (1.00 g, 5.47 mmol, 1.00 eq) und Natriumcarbonat (0.58 g, 5.47 mmol, 1.00 eq) wurden in Wasser (5 mL) vorgelegt. Anschließend wurde Kupfersulfat-Pentahydrat (1.37 g, 5.47 mmol, 1.00 eq) in Wasser (4 mL) gelöst, zur Lösung hinzugegeben und das Gemisch 15 min gerührt. Dann wurde Kaliumcyanat (0.58 g, 7.11 mmol, 1.30 eq) hinzugegeben und die Lösung bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ für 4 h gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und anschließend in Aceton (6 mL) suspendiert. Zur Suspension wurde 8-Hydroxychinolin (1.03 g, 7.11 mmol, 1.30 eq) gegeben, die Lösung mit Wasser (6 mL) verdünnt und für 2.5 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde filtriert und das Filtrat mit EtOAc (3 x 10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde eingeeengt und gefriergetrocknet. Es wurden 0.40 g (2.11 mmol, 39%) des H-L-Hci-OH als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, D_2O ; δ = 3.73 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$), 3.12 (t, 2H, 3J = 6.5 Hz, $\text{CH}\epsilon$), 2.06-1.67 (m, 2H, $\text{CH}\beta$), 1.67-1.31 (m, 4H, $\text{CH}\gamma$ und $\text{CH}\delta$) ppm.

HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3 + 1\text{Na}]^{1+}$, ber.: 212.1004, gef.: 212.1006.

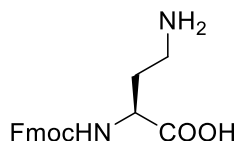
6.6.2 Darstellung von Fmoc-L-Hci-OH (AS3)



L-Homocitrullin (0.35 g, 1.84 mmol, 1.00 eq) und NaHCO_3 (0.16 g, 1.94 mmol, 1.30 eq) wurden in Wasser (5 mL) gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Fmoc-OSu (0.55 g, 1.64 mmol, 1.10 eq), gelöst in Dioxan (5 mL), wurde langsam zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz (16 h) gerührt. Das Dioxan wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Lösung wurde mit HCl (1M in Wasser) auf pH 2 gebracht und dann mit EtOAc (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Nach Trocknung im Feinvakuum wurden 0.715 g (1.74 mmol, 95%.) des Fmoc-L-Hci-OH als farbloser Feststoff erhalten.

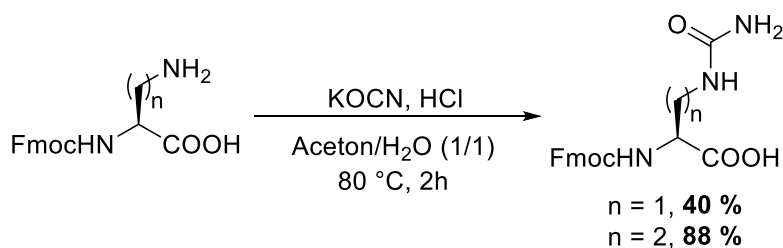
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 7.89 (d, 2H, 3J = 7.6 Hz, Fmoc- H_{arom}), 7.73 (d, 2H, 3J = 7.6 Hz, Fmoc- H_{arom}), 7.63 (d, 1H, 3J = 8.3 Hz, $\text{NH}\alpha$), 7.42 (t, 2H, 3J = 7.6 Hz, Fmoc- H_{arom}), 7.33 (t, 2H, 3J = 7.6 Hz, Fmoc- H_{arom}), 5.92 (t, 1H, 3J = 6.0 Hz, $\text{NH}\zeta$), 5.46-5.24 (m, 2H, $\text{NH}_2\theta$), 4.32-4.17 (m, 3H, Fmoc- CHCH_2O , Fmoc- CHCH_2O), 3.91 (td, 1H, 3J = 8.4, 3J = 5.0, $\text{CH}\alpha$), 3.00-2.87 (m, 2H, $\text{CH}\epsilon$), 1.77-1.50 (m, 2H, $\text{CH}\beta$), 1.43-1.22 (m, 4H, $\text{CH}\gamma$ und $\text{CH}\delta$) ppm.

HR-MS (ESI+): für $[\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5 + 1\text{Na}]^{1+}$, ber.: 434.1686, gef.: 434.1690.

Fmoc-L-Dab-OH (AS7)

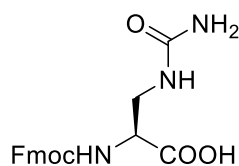
Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift x.5.1 aus Fmoc-L-Gln-OH (2.00 g, 5.64 mmol, 1.00 eq). Es wurden 1.08 g (3.31 mmol, 52%) des Fmoc-L-Dab-OH als beiger Feststoff erhalten.

¹H-NMR: 300 MHz, DMSO-*d*₆; δ = 7.89 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.68 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.41 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.32 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc-H_{arom}), 6.77-6.64 (m, 1H, NH α), 4.34-4.15 (m, 3H, Fmoc-CHCH₂O und Fmoc-CHCH₂O), 3.74-3.60 (m, 1H, CH α), 2.99-2.80 (m, 1H, CH β^t), 1.99-1.69 (m, 1H, CH β^h) ppm.

6.6.4 Vorschrift zur Carbamylierung von Fmoc-L-Dap-OH und Fmoc-L-Dab-OH

Eine Suspension aus Fmoc-L-Dap-OH oder Fmoc-L-Dab-OH (1.00 eq) und Kaliumcyanat in Salzsäure (1 M in Wasser, 1.00 eq), Aceton (3.00 mL) und Wasser (3.00 mL) wurde unter Rückfluss bei 80 °C gerührt. Um die zunehmende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe zu verhindern, wurde die Reaktion nach 2 h abgebrochen. Die Reaktionslösung wurde mit Et₂O (3 x 5 mL) gewaschen, die wässrige Phase mit 6 M Salzsäure auf pH 2 gebracht und anschließend mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Abschließend wurde im Feinvakuum getrocknet.

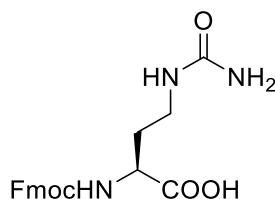
Fmoc-Alb-OH (AS8)



¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}; δ = 7.90 (d, 2H, 3J = 7.8 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.74 (d, 2H, 3J = 7.8 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.69 (d, 1H, 3J = 7.5 Hz, NH α), 7.43 (t, 2H, 3J = 7.8 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.34 (t, 2H, 3J = 7.8 Hz, Fmoc-H_{arom}), 6.19 (t, 1H, 3J = 6.0 Hz, NH γ), 5.81-5.67 (m, 2H, NH₂ ϵ), 4.42-4.17 (m, 4H, CH α , Fmoc-CHCH₂O und Fmoc-CHCH₂O), 3.18 (dd, 1H, 3J = 5.3 Hz, 2J = 12.9 Hz, CH β^t), 3.03 (dd, 1H, 3J = 9.0 Hz, 2J = 12.9 Hz, CH β^h) ppm.

HR-MS (ESI+): für [C₁₉H₁₉N₃O₅+1Na]¹⁺, ber.: 392.1220, gef.: 392.1219.

Fmoc-Aub-OH (AS9)



¹H-NMR: 300 MHz, DMSO_{d6}; δ = 7.89 (d, 2H, 3J = 7.7 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.73 (d, 2H, 3J = 7.7 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.70 (d, 1H, 3J = 7.4 Hz, NH α), 7.41 (t, 2H, 3J = 7.7 Hz, Fmoc-H_{arom}), 7.34 (t, 2H, 3J = 7.7 Hz, Fmoc-H_{arom}), 6.20 (m, 1H, NH δ), 5.61-5.46 (m, 2H, NH₂ ζ), 4.31-4.16 (m, 3H, Fmoc-CHCH₂O und Fmoc-CHCH₂O), 4.05-3.92 (m, 1H, CH α), 3.17-2.90 (m, 2H, CH γ), 1.93-1.77 (m, 1H, CH β^t), 1.76-1.60 (m, 1H, CH β^h) ppm.

HR-MS (ESI+): für [C₂₀H₂₁N₃O₅+1Na]¹⁺, ber.: 407.1373, gef.: 407.1376.

7. Quellenverzeichnis

- [1] D. Kanduc, *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 3283–3289.
- [2] G. Lucchese, M. Calabro, D. Kanduc, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 832–839.
- [3] K. Kessenbrock, R. Raijmakers, M. J. Fritzler, M. Mahler, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2831–2838.
- [4] M. J. Gómara, I. Haro, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 531–546.
- [5] T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness, D. P. Fairlie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13020–13041.
- [6] P. E. Wright, H. J. Dyson, R. A. Lerner, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7167–7175.
- [7] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 519–538.
- [8] J. J. Marchalonis, M. K. Adelman, I. F. Robey, S. F. Schluter, A. B. Edmundson, *J. Mol. Recognit.* **2001**, *14*, 110–121.
- [9] R. Huber, *Science* **1986**, *233*, 702–703.
- [10] M. H. Van Regenmortel, J. L. Pellequer, *Pept. Res.* **1994**, *7*, 224–228.
- [11] M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, T. N. Grossmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8896–8927.
- [12] J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167–339.
- [13] S. H. Gellman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 717–725.
- [14] J. A. Robinson, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1278–1288.
- [15] D. Obrecht, E. Chevalier, K. Moehle, J. A. Robinson, *Drug Discov. Today Technol.* **2012**, *9*, e63–e69.
- [16] D. R. Ripoll, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 575–581.
- [17] H. J. Dyson, P. E. Wright, *FASEB J.* **1995**, *9*, 37–42.
- [18] J. D. A. Tyndall, B. Pfeiffer, G. Abbenante, D. P. Fairlie, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 793–826.
- [19] S. Pandey, M. C. Alcaro, M. Scrima, E. Peroni, I. Paolini, S. Di Marino, F. Barbetti, A. Carotenuto, E. Novellino, A. M. Papini, et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10437–10447.
- [20] M. A. Jiménez, in *Protein Design: Methods and Applications*, Springer, New York, **2014**, S. 15–52.
- [21] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872–4897.
- [22] F. A. Syud, J. F. Espinosa, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11577–11578.

- [23] F. Freire, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7970–7972.
- [24] A. C. Conibear, S. Chaousis, T. Durek, K. J. Rosengren, D. J. Craik, C. I. Schroeder, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2015**, *106*, 89–100.
- [25] C. J. White, A. K. Yudin, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 509–524.
- [26] K. Kawano, T. Yoneya, T. Miyata, K. Yoshikawa, F. Tokunaga, Y. Terada, S. Iwanaga, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15365–15367.
- [27] A. G. Cochran, R. T. Tong, M. A. Starovasnik, E. J. Park, R. S. McDowell, J. E. Theaker, N. J. Skelton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 625–632.
- [28] C. M. Santiveri, E. León, M. Rico, M. A. Jiménez, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 488–499.
- [29] J. H. Park, M. L. Waters, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 69–77.
- [30] L. Y. Chan, V. M. Zhang, Y. H. Huang, N. C. Waters, P. S. Bansal, D. J. Craik, N. L. Daly, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 617–624.
- [31] R. V. Nair, S. B. Baravkar, T. S. Ingole, G. J. Sanjayan, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13874–13884.
- [32] T. S. Haque, J. C. Little, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6975–6985.
- [33] R. Kaul, P. Balaram, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 105–117.
- [34] M. Favre, K. Moehle, L. Jiang, B. Pfeiffer, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2679–2685.
- [35] Z. Athanassiou, R. L. A. Dias, K. Moehle, N. Dobson, G. Varani, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6906–6913.
- [36] B. Chatterjee, I. Saha, S. Raghothama, S. Aravinda, R. Rai, N. Shamala, P. Balaram, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6192–6204.
- [37] I. L. Karle, S. K. Awasthi, P. Balaram, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 8189–8193.
- [38] T. S. Haque, J. C. Little, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4105–4106.
- [39] H. E. Stanger, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4236–4237.
- [40] L. R. Masterson, M. A. Etienne, F. Porcelli, G. Barany, R. P. Hammer, G. Veglia, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2007**, *88*, 746–753.
- [41] M. Ramírez-Alvarado, F. J. Blanco, L. Serrano, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 604–612.
- [42] M. T. Pastor, M. López de la Paz, E. Lacroix, L. Serrano, E. Pérez-Payá, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 614–619.
- [43] U. Nagai, K. Sato, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647–650.
- [44] B. Eckhardt, W. Grosse, L.-O. Essen, A. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 18336–18341.

- [45] A. Aemissegger, V. Kräutler, W. F. van Gunsteren, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2929–2936.
- [46] E. G. Hutchinson, R. B. Sessions, J. M. Thornton, D. N. Woolfson, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2287–2300.
- [47] A. G. Cochran, N. J. Skelton, M. A. Starovasnik, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 5578–5583.
- [48] E. de Alba, M. Rico, M. A. Jiménez, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 2548–2560.
- [49] B. Ciani, M. Jourdan, M. S. Searle, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9038–9047.
- [50] B. M. P. Huyghues-Despointes, X. Qu, J. Tsai, J. M. Scholtz, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2006**, *63*, 1005–1017.
- [51] R. M. Hughes, M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6518–6519.
- [52] A. J. Riemen, M. L. Waters, *Biochemistry* **2009**, *24*, 1525–1531.
- [53] L. L. Cline, M. L. Waters, *Biopolymers* **2009**, *92*, 502–507.
- [54] J. F. Espinosa, S. H. Gellman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2330–2333.
- [55] G. Colombo, G. M. S. De Mori, D. Roccatano, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 538–550.
- [56] S. Meier, S. Güthe, T. Kiefhaber, S. Grzesiek, *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 1051–1069.
- [57] T. Blandl, A. G. Cochran, N. J. Skelton, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 237–247.
- [58] F. R. Salemme, D. W. Weatherford, *J. Mol. Biol.* **1981**, *146*, 119–141.
- [59] F. R. Salemme, *Nature* **1982**, *299*, 754–756.
- [60] F. R. Salemme, *Ann. New York Acad. Sci.* **1985**, *439*, 97–106.
- [61] R. M. Levy, M. Karplus, *Biopolymers* **1979**, *18*, 2465–2495.
- [62] F. R. Salemme, D. W. Weatherford, *J. Mol. Biol.* **1981**, *146*, 101–117.
- [63] R. Medzhitov, C. A. Janeway, *Semin. Immunol.* **2000**, *12*, 185–188–344.
- [64] A. I. Tauber, *J. Theor. Biol.* **2015**, *375*, 52–60.
- [65] A. I. Tauber, *Perspect. Biol. Med.* **1999**, *42*, 459–474.
- [66] S. Avrameas, *Immunol. Today* **1991**, *12*, 154–159.
- [67] A. I. Tauber, *Semin. Immunol.* **2000**, *12*, 241–248.
- [68] T. Pradeu, E. D. Carosella, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 17858–17861.
- [69] D. Kanduc, *Self. Nonself.* **2010**, *1*, 255–258.
- [70] L. Rink, A. Kruse, H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2012**.
- [71] J.-M. Claverie, P. Kourilsky, P. Langlade-Demoyen, A. Chalufour-Prochnicka, G. Dadaglio, F. Tekaia, F. Plata, L. Bougueleret, *Eur. J. Immunol.* **1988**, *18*, 1547–1554.

- [72] D. Kanduc, L. Tessitore, G. Lucchese, A. Kusalik, E. Farber, F. M. Marincola, *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, 57, 1215–1223.
- [73] A. Stufano, D. Kanduc, *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, 86, 36–40.
- [74] A. Lucchese, S. Stevanovic, A. A. Sinha, A. Mittelman, D. Kanduc, *Peptides* **2003**, 24, 193–197.
- [75] R. A. Lerner, *Nature* **1982**, 299, 592–596.
- [76] R. B. Merrifield, *Science* **1986**, 232, 341–347.
- [77] R. B. Merrifield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, 24, 799–892.
- [78] M. Mahler, M. Blüthner, K. M. Pollard, *Clin. Immunol.* **2003**, 107, 65–79.
- [79] M. Mahler, R. Raijmakers, C. Dähnrich, M. Blüthner, M. J. Fritzler, *Arthritis Res. Ther.* **2005**, 7, R704–713.
- [80] M. Mahler, M. J. Fritzler, M. Blüthner, *Arthritis Res. Ther.* **2005**, 7, R19–29.
- [81] G. Riemekasten, J. Marell, G. Trebeljahr, R. Klein, G. Hausdorf, T. Häupl, J. Schneider-Mergener, G. R. Burmester, F. Hiepe, *J. Clin. Invest.* **1998**, 102, 754–763.
- [82] A. A. Sinha, M. T. Lopez, H. O. McDevitt, *Science* **1990**, 248, 1380–1388.
- [83] D. L. Jacobson, S. J. Gange, N. R. Rose, N. M. H. Graham, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1997**, 84, 223–243.
- [84] G. A. Schellekens, H. Visser, B. A. W. de Jong, F. H. J. van den Hoogen, J. M. W. Hazes, F. C. Breedveld, W. J. van Venrooij, *Arthritis Rheum.* **2000**, 43, 155–163.
- [85] N. Haneji, T. Nakamura, K. Takio, K. Yanagi, H. Higashiyama, I. Saito, S. Noji, H. Sugino, Y. Hayashi, *Science* **1997**, 276, 604–607.
- [86] J. He, Q. L. Chen, Z. G. Li, *Ann. Rheum. Dis.* **2006**, 65, 549–550.
- [87] C. Rizou, J. P. Ioannidis, E. Panou-Pomonis, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, H. M. Moutsopoulos, P. G. Vlachoyiannopoulos, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2000**, 22, 344–351.
- [88] E. Genth, *J. Lab. Med.* **2002**, 26, 130–136.
- [89] J. Strunk, U. Lange, U. Müller-Ladner, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **2005**, 130, 1761–1768.
- [90] J. S. Smolen, D. Aletaha, I. B. McInnes, *Lancet* **2016**, 388, 2023–2038.
- [91] K. Egerer, E. Feist, G.-R. Burmester, *Dtsch. Arztebl.* **2009**, 106, 159–163.
- [92] G. A. Schellekens, B. A. W. de Jong, F. H. J. van den Hoogen, L. B. A. van de Putte, W. J. van Venrooij, *J. Clin. Invest.* **1998**, 101, 273–281.
- [93] W. J. Van Venrooij, G. J. M. Pruijn, *Arthritis Res.* **2000**, 2, 249–251.

- [94] B. György, E. Tóth, E. Tarcsa, A. Falus, E. I. Buzás, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, 38, 1662–1677.
- [95] J. L. Ochoa, J. Porath, J. Kempf, J.-M. Egly, *J. Chromatogr.* **1980**, 188, 257–261.
- [96] R. B. M. Landewé, *Arthritis Rheum.* **2003**, 48, 1–5.
- [97] W. J. van Venrooij, G. J. M. Pruijn, *Arthritis Res. Ther.* **2008**, 10, 117.
- [98] W. J. van Venrooij, J. J. B. C. van Beers, G. J. M. Pruijn, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2011**, 7, 391–398.
- [99] E. R. Vossenaar, W. J. van Venrooij, *Arthritis Res. Ther.* **2004**, 6, 107–111.
- [100] F. van Gaalen, A. Ioan-Facsinay, T. W. J. Huizinga, R. E. M. Toes, *J. Immunol.* **2005**, 175, 5575–5580.
- [101] W. J. Van Venrooij, J. J. B. C. Van Beers, G. J. M. Pruijn, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, 1143, 268–285.
- [102] J. A. Hill, D. Wang, A. M. Jevnikar, E. Cairns, D. A. Bell, *Arthritis Res. Ther.* **2003**, 5, R40–R48.
- [103] X. Zhao, N. L. Okeke, O. Sharpe, F. M. Batliwalla, A. T. Lee, P. P. Ho, B. H. Tomooka, P. K. Gregersen, W. H. Robinson, *Arthritis Res. Ther.* **2008**, 10, R94.
- [104] K. N. Verpoort, C. M. Jol-Van Der Zijde, E. A. M. Papendrecht-Van Der Voort, A. Ioan-Facsinay, J. W. Drijfhout, M. J. D. Van Tol, F. C. Breedveld, T. W. J. Huizinga, R. E. M. Toes, *Arthritis Rheum.* **2006**, 54, 3799–3808.
- [105] T. Dörner, K. Egerer, E. Feist, G. R. Burmester, *Curr. Opin. Rheumatol.* **2004**, 16, 246–253.
- [106] B. J. Young, R. K. Mallya, R. D. Leslie, C. J. Clark, T. J. Hamblin, *Br. Med. J.* **1979**, 2, 97–99.
- [107] M. Sebbag, M. Simon, C. Vincent, C. Masson-Bessiere, E. Girbal, J. J. Durieux, G. Serre, *J. Clin. Invest.* **1995**, 95, 2672–2679.
- [108] K. Lundberg, A. Kinloch, B. A. Fisher, N. Wegner, R. Wait, P. Charles, T. R. Mikuls, P. J. Venables, *Arthritis Rheum.* **2008**, 58, 3009–3019.
- [109] G. J. Pruijn, A. Wiik, W. J. van Venrooij, *Arthritis Res. Ther.* **2010**, 12, 203.
- [110] G. Spraggon, S. J. Everse, R. F. Doolittle, *Nature* **1997**, 389, 455–462.
- [111] S. V. Strelkov, H. Herrmann, N. Geisler, T. Wedig, R. Zimbelmann, U. Aebi, P. Burkhard, *EMBO J.* **2002**, 21, 1255–1266.
- [112] C. Gerstner, A. Dubnovitsky, C. Sandin, G. Kozhukh, H. Uchtenhagen, E. A. James, J. Rönnlid, A. J. Ytterberg, J. Pieper, E. Reed, et al., *Front. Immunol.* **2016**, 7, 494.

- [113] M. Sebbag, N. Moinard, I. Auger, C. Clavel, J. Arnaud, L. Nogueira, J. Roudier, G. Serre, *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36*, 2250–2263.
- [114] V. Saulot, O. Vittecoq, R. Charlionet, P. Fardellone, C. Lange, L. Marvin, N. Machour, X. Le Loët, D. Gilbert, F. Tron, *Arthritis and Rheum.* **2002**, *46*, 1196–1201.
- [115] N. Després, G. Boire, F. J. Lopez-Longo, H. A. Ménard, *J. Rheumatol.* **1994**, *21*, 1027–1033.
- [116] E. R. Vossenaar, N. Després, E. Lapointe, A. Van Der Heijden, M. Lora, T. Senshu, W. J. Van Venrooij, H. A. Ménard, *Arthritis Res. Ther.* **2004**, *6*, R142–150.
- [117] H. Bang, K. Egerer, A. Gaudiard, K. Lütke, P. E. Rudolph, G. Fredenhagen, W. Berg, E. Feist, G.-R. Burmester, *Arthritis Rheum.* **2007**, *56*, 2503–2511.
- [118] C. Dejaco, W. Klotz, H. Larcher, C. Duftner, M. Schirmer, M. Herold, *Arthritis Res. Ther.* **2006**, *8*, R119.
- [119] L. Mathsson, M. Mullazehi, M. C. Wick, O. Sjöberg, R. Van Vollenhoven, L. Klareskog, J. Rönnelid, *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 36–45.
- [120] J. Shi, R. Knevel, P. Suwannalai, M. P. van der Linden, G. M. C. Janssen, P. A. van Veelen, N. E. W. Levarht, A. H. M. van der Helm-van Mil, A. Cerami, T. W. J. Huizinga, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 17372–17377.
- [121] X. Jiang, L. A. Trouw, T. J. Van Wesemael, J. Shi, C. Bengtsson, H. Källberg, V. Malmström, L. Israelsson, H. Hreggvidsdottir, W. Verduijn, et al., *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 1761–1768.
- [122] P. Mydel, Z. Wang, M. Brisslert, L. E. Dahlberg, S. L. Hazen, S. L. Hazen, M. Bokarewa, *J. Immunol.* **2010**, *184*, 6882–6890.
- [123] Z. Wang, S. J. Nicholls, E. R. Rodriguez, O. Kumm, S. Hörkkö, J. Barnard, W. F. Reynolds, E. J. Topol, J. A. DiDonato, S. L. Hazen, et al., *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1176–1184.
- [124] M. C. Levesque, Z. Zhou, L. W. Moreland, *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 2211–2215.
- [125] H. A. Ménard, *J. Rheumatol.* **2015**, *42*, 733–735.
- [126] K. Conrad, D. Roggenbuck, D. Reinhold, T. D??rner, *Autoimmun. Rev.* **2010**, *9*, 431–435.
- [127] E. Feist, K. Egerer, G. R. Burmester, *Z. Rheumatol.* **2007**, *66*, 212–218.
- [128] M. H. V. Van Regenmortel, S. Muller, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 377–382.
- [129] F. Lipmann, R. D. Hotchkiss, R. J. Dubos, *J. Biol. Chem.* **1941**, *141*, 163–169.
- [130] R. Mahalakshmi, P. Balaram, in *D-Amino Acids A New Frontier Amino Acid and Protein Research*, Nova Science Publishers, New York, **2006**, S. 415–430.

- [131] H. Kleinkauf, H. Von Döhren, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 236, 335–351.
- [132] G. Kreil, *Ann. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 337–345.
- [133] A. G. Craig, P. Bandyopadhyay, B. M. Olivera, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 264, 271–275.
- [134] J. Venkatraman, S. C. Shankaramma, P. Balaram, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3131–3152.
- [135] S. Rothmund, M. Beyermann, E. Krause, G. Krause, M. Bienert, R. S. Hodges, B. D. Sykes, F. D. Sönnichsen, *Biochemistry* **1995**, 34, 12954–12962.
- [136] S. Rothmund, E. Krause, M. Beyermann, M. Dathe, M. Bienert, R. S. Hodges, B. D. Sykes, F. D. Sönnichsen, *Pept. Res.* **1996**, 9, 79–87.
- [137] R. Mahalakshmi, S. Raghothama, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1125–1138.
- [138] C. Das, S. Raghothama, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5812–5813.
- [139] C. Das, P. Balaram, S. Raghothama, *Chem. Commun.* **1999**, 967–968.
- [140] J. Venkatraman, G. A. Naganagowda, R. Sudha, P. Balaram, *Chem. Commun.* **2001**, 2660–2661.
- [141] J. Venkatraman, G. A. Nagana Gowda, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4987–4994.
- [142] S. Aravinda, N. Shamala, R. Rajkishore, H. N. Gopi, P. Balaram, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3863–3865.
- [143] S. Rana, B. Kundu, S. Durani, *Chem. Commun.* **2004**, 2462–3.
- [144] S. Rana, B. Kundu, S. Durani, *Chem. Commun.* **2005**, 207–209.
- [145] S. Rana, B. Kundu, S. Durani, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 3874–3882.
- [146] S. Rana, B. Kundu, S. Durani, *Biopolymers* **2007**, 87, 231–243.
- [147] G. Bhupesh, K. Patel, K. R. Srivastava, S. Durani, *RSC Adv.* **2015**, 5, 105400–105408.
- [148] B. Goyal, K. R. Srivastava, K. Patel, S. Durani, *ChemistrySelect* **2016**, 1, 2050–2057.
- [149] S. Durani, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1301–1308.
- [150] S. Aravinda, N. Shamala, S. Desiraju, P. Balaram, *Chem. Commun.* **2002**, 2454–2455.
- [151] I. L. Karle, H. N. Gopi, P. Balaram, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100, 13946–13951.
- [152] R. Fairman, S. J. Anthony-Cahill, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5458–5459.
- [153] S. Aravinda, N. Shamala, A. Bandyopadhyay, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15065–15075.
- [154] R. Chandrasekaran, B. V. V. Prasad, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1978**, 5, 125–161.
- [155] D. W. Urry, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, 68, 672–6.
- [156] W. R. Veatch, E. T. Fossel, E. R. Blout, *Biochemistry* **1974**, 13, 5249–5256.
- [157] G. Bunkoczi, L. Vertesy, G. M. Sheldrick, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1340–1342

- [158] L. E. Townsley, W. A. Tucker, S. Sham, J. F. Hinton, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11676–11686.
- [159] D. A. Langs, *Science* **1988**, *241*, 188–191.
- [160] M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 901–926.
- [161] S. E. Northfield, C. K. Wang, C. I. Schroeder, T. Durek, M. W. Kan, J. E. Swedberg, D. J. Craik, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 248–257.
- [162] K. K. Jain, *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2000**, *9*, 2403–2410.
- [163] A. P. Bryant, R. W. Busby, W. P. Bartolini, E. A. Cordero, G. Hannig, M. M. Kessler, C. M. Pierce, R. M. Solinga, J. V. Tobin, S. Mahajan-Miklos, et al., *Life Sci.* **2010**, *86*, 760–765.
- [164] G. F. King, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *11*, 1469–1484.
- [165] D. Andreu, F. Albericio, N. A. Solé, M. C. Munson, M. Ferrer, G. Barany, *Methods Mol. Biol.* **1994**, *35*, 91–169.
- [166] L. Moroder, H. J. Musiol, M. Götz, C. Renner, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2005**, *80*, 85–97.
- [167] M. Akcan, D. J. Craik, in *Methods in Molecular Biology: Peptide Synthesis and Applications*, **2013**, S. 89–101.
- [168] T. M. Postma, F. Albericio, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 3519–3530.
- [169] M. Narayan, E. Welker, W. J. Wedemeyer, H. A. Scheraga, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 805–812.
- [170] L. Cascales, D. J. Craik, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5035–5047.
- [171] M. Cemazar, S. Kwon, T. Mahatmanto, A. S. Ravipati, D. J. Craik, *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1534–1545.
- [172] T. M. DeSilva, G. Veglia, F. Porcelli, A. M. Prantner, S. J. Opella, *Biopolymers* **2002**, *64*, 189–197.
- [173] S. J. Opella, T. M. DeSilva, G. Veglia, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 217–223.
- [174] A. Hoppe, M. E. Pandelia, W. Gärtner, W. Lubitz, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1807*, 1414–1422.
- [175] G. Bhardwaj, V. K. Mulligan, C. D. Bahl, J. M. Gilmore, P. J. Harvey, O. Cheneval, G. W. Buchko, S. V. S. R. K. Pulavarti, Q. Kaas, A. Eletsky, et al., *Nature* **2016**, *538*, 329–335.
- [176] Y. Zheng, Z. Li, J. Ren, W. Liu, Y. Wu, Y. Zhao, C. Wu, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2547–2552.

- [177] A. Schrimpf, U. Linne, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2512–2521.
- [178] L. Moroder, D. Besse, H. J. Musiol, S. Rudolph-Bohner, F. Siedler, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **1996**, *40*, 207–234.
- [179] G. Bulaj, *Biotechnol. Adv.* **2005**, *23*, 87–92.
- [180] T. E. Creighton, *J. Mol. Biol.* **1974**, *87*, 603–624.
- [181] M. Qin, W. Wang, D. Thirumalai, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 11241–11246.
- [182] G. L. Callewaert, R. Shipolini, C. A. Vernon, *FEBS Lett.* **1968**, *1*, 111–113.
- [183] S. Pegoraro, S. Fiori, J. Cramer, S. Rudolph-Böhner, L. Moroder, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1605–13.
- [184] A. M. Steiner, G. Bulaj, *J. Biopolymers (Pept. Sci.)* **2011**, *17*, 1–7.
- [185] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2009**.
- [186] A. Isidor-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.
- [187] Y. Zheng, L. Zhai, Y. Zhao, C. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15094–15097.
- [188] C. Wu, J.-C. Leroux, M. A. Gauthier, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 1044–1049.
- [189] W. H. H. Günther, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3931–3933.
- [190] R. Singh, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6931–6933.
- [191] D. Besse, L. Moroder, *J. Biopolymers (Pept. Sci.)* **1997**, *3*, 442–453.
- [192] D. Besse, F. Siedler, T. Diercks, H. Kessler, L. Moroder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 883–885.
- [193] D. Besse, N. Budisa, W. Karnbrock, C. Minks, H. J. Musiol, S. Pegoraro, F. Siedler, E. Weyher, L. Moroder, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 211–218.
- [194] S. Pegoraro, S. Fiori, S. Rudolph-Bohner, T. X. Watanabe, L. Moroder, *J Mol Biol* **1998**, *284*, 779–792.
- [195] T. S. Han, M. M. Zhang, K. H. Gowd, A. Walewska, D. Yoshikami, B. M. Olivera, G. Bulaj, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 140–144.
- [196] A. M. Steiner, K. J. Woycechowsky, B. M. Olivera, G. Bulaj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5580–5584.
- [197] S. Fiori, S. Pegoraro, S. Rudolph-Böhner, J. Cramer, L. Moroder, *Biopolymers* **2000**, *53*, 550–564.
- [198] D. J. Campopiano, D. J. Clarke, N. C. Polfer, P. E. Barran, R. J. Langley, J. R. W. Govan, A. Maxwell, J. R. Dorin, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48671–48679.
- [199] T. Hara, H. Kodama, M. Kondo, K. Wakamatsu, A. Takeda, T. Tachi, K. Matsuzaki, *Biopolymers* **2001**, *58*, 437–446.

- [200] M. Pons, F. Albericio, M. Royo, E. Giralt, *Synlett* **1999**, 2, 172–181.
- [201] S. Hyun, S. Lee, S. Kim, S. Jang, J. Yu, Y. Lee, *Biomacromolecules* **2014**, 15, 3746–3752.
- [202] Y. Chen, C. Yang, T. Li, M. Zhang, Y. Liu, M. A. Gauthier, Y. Zhao, C. Wu, *Biomacromolecules* **2015**, 16, 2347–2355.
- [203] A. J. Wommack, J. J. Ziarek, J. Tomaras, H. R. Chileveru, Y. Zhang, G. Wagner, E. M. Nolan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 13494–13497.
- [204] S. P. Liu, L. Zhou, R. Lakshminarayanan, R. W. Beuerman, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2010**, 16, 199–213.
- [205] S. P. Black, J. K. M. Sanders, A. R. Stefankiewicz, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1861–1872.
- [206] F. B. L. Cougnon, N. Ponnuswamy, N. A. Jenkins, G. D. Pantoş, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 19129–19135.
- [207] J. B. Adlersberg, *Ric. Clin. Lab.* **1976**, 6, 191–205.
- [208] L. Moroder, G. Hübener, S. Göhring-Romani, W. Göhring, H.-J. Musiol, E. Wünsch, *Tetrahedron* **1990**, 46, 3305–3314.
- [209] H. Kessler, S. Mronga, G. Müller, L. Moroder, R. Huber, *Biopolymers* **1991**, 31, 1189–1204.
- [210] L. Moroder, H. Musiol, K. Kocher, J. P. Bali, C. H. Schneider, W. Guba, G. Müller, D. F. Mierke, H. Kessler, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 212, 325–333.
- [211] P. Terness, I. Kohl, G. Hubener, R. Battistutta, L. Moroder, M. Welschof, C. Dufter, M. Finger, C. Hain, M. Jung, et al., *J. Immunol.* **1995**, 154, 6446–6452.
- [212] W. Müller-Esterl, O. Anderka, U. Brandt, S. Kerscher, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2011**.
- [213] G. M. Edelman, *Science* **1973**, 180, 830–840.
- [214] C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York, **1991**.
- [215] K. Elgert, in *Immunology: Understanding the Immune System*, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1998**, S. 58–78.
- [216] O. H. Brekke, T. E. Michaelsen, I. Sandlie, *Immunol. Today* **1995**, 16, 85–90.
- [217] V. N. Schumaker, M. L. Phillips, D. C. Hanson, *Mol. Immunol.* **1991**, 28, 1347–1360.
- [218] K. H. Roux, L. Strelets, T. E. Michaelsen, *J Immunol* **1997**, 159, 3372–3382.
- [219] E. O. Saphire, R. L. Stanfield, M. D. Max Crispin, P. W. H. I. Parren, P. M. Rudd, R. A. Dwek, D. R. Burton, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 9–18.

- [220] S. Sandin, L. G. Öfverstedt, A. C. Wikström, Ö. Wrange, U. Skoglund, *Structure* **2004**, *12*, 409–415.
- [221] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, H. Alexander, R. A. Houghten, A. J. Olson, R. A. Lerner, W. A. Henrickson, *Nature* **1984**, *312*, 127–134.
- [222] K. H. Roux, L. Strelets, O. H. Brekke, I. Sandlie, T. E. Michaelsen, *J. Immunol.* **1998**, *161*, 4083–4090.
- [223] H. Liu, K. May, *MAbs* **2012**, *4*, 17–23.
- [224] J. L. Dangl, T. G. Wensel, S. L. Morrison, L. Stryer, L. A. Herzenberg, V. T. Oi, *EMBO J.* **1988**, *7*, 1989–1994.
- [225] M. Klein, N. Haeffner-Cavaillon, D. E. Isenman, C. Rivat, M. A. Navia, D. R. Davies, K. J. Dorrington, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 524–528.
- [226] L. W. Guddat, J. N. Herron, A. B. Edmundson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 4271–4275.
- [227] M. J. Coloma, K. R. Trinh, L. A. Wims, S. L. Morrison, *J. Immunol.* **1997**, *158*, 733–40.
- [228] L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, A. McPherson, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1581–1597.
- [229] K. Uray, F. Hudecz, *Amino Acids, Pept. Proteins* **2014**, *39*, 68–113.
- [230] S. Ramesh, P. Cherkupally, T. Govender, H. G. Kruger, F. Albericio, B. G. De La Torre, in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Elsevier Inc., **2015**, S. 99–130.
- [231] M. Skwarczynski, I. Toth, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 842–845.
- [232] P. I. Kitov, D. R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271–16284.
- [233] T. Vorup-Jensen, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1759–1781.
- [234] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 5409–5413.
- [235] S. Mukherjee, J. Zhu, J. Zikherman, R. Parameswaran, T. A. Kadlecsek, Q. Wang, B. Au-Yeung, H. Ploegh, J. Kuriyan, J. Das, et al., *Sci. Signal.* **2013**, *6*, ra1.
- [236] J. P. Tam, *J. Immunol. Methods* **1989**, *124*, 53–61.
- [237] T. F. I. S. Group, *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 1915–1927.
- [238] N. D. Zegers, C. van Holten, E. Claassen, W. J. A. Boersma, *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23*, 630–634.
- [239] W. Kowalczyk, A. Mascaraque, M. Sánchez-navarro, J. Rojo, D. Andreu, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4565–4573.

- [240] M. Monsó, W. Kowalczyk, D. Andreu, B. G. de la Torre, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3116–3121.
- [241] M. Monsó, B. G. De La Torre, E. Blanco, N. Moreno, D. Andreu, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 578–585.
- [242] P. M. Moyle, C. Olive, M. F. Ho, M. Burgess, L. Karpati, M. F. Good, I. Toth, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6846–6850.
- [243] L. Bourel-Bonnet, D. Bonnet, F. Malingue, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 494–499.
- [244] S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 34–41.
- [245] C. Olive, M. Ho, J. Dyer, D. Lincoln, N. Barozzi, I. Toth, M. F. Good, *J. Infect. Dis.* **2006**, *193*, 1666–1676.
- [246] A. G. Jamieson, N. Boutard, D. Sabatino, W. D. Lubell, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 148–165.
- [247] R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1974**, *6*, 397–405.
- [248] B. C. Cunningham, J. A. Wells, *Science* **1989**, *244*, 1081–1085.
- [249] G. A. Weiss, C. K. Watanabe, A. Zhong, A. Goddard, S. S. Sidhu, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 8950–4.
- [250] K. L. Morrison, G. A. Weiss, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 302–307.
- [251] A. L. Roth, E. Marzola, A. Rizzi, M. Arduin, C. Trapella, C. Corti, R. Vergura, P. Martinelli, S. Salvadori, D. Regoli, et al., *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20809–20816.
- [252] T. Herning, K. Yutani, K. Inaka, R. Kuroki, M. Matsushima, M. Kikuchi, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7077–85.
- [253] S. Reinelt, M. Marti, S. Dédier, T. Reitingner, G. Folkers, J. A. López De Castro, D. Rognan, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24525–24530.
- [254] N. Boutard, A. G. Jamieson, H. Ong, W. D. Lubell, *Chem. Biol. Drug. Des.* **2010**, *40*–50.
- [255] M. Haack, S. Enck, H. Seger, A. Geyer, A. G. Beck-Sickinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8326–8336.
- [256] C. T. Dooley, R. A. Houghten, *Life Sci.* **1993**, *52*, 1509–1517.
- [257] T. A. Rano, T. Timkey, E. P. Peterson, J. Rotonda, D. W. Nicholson, J. W. Becker, K. T. Chapman, N. A. Thornberry, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 149–155.
- [258] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.

- [259] H. Matter, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3347–3359.
- [260] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem* **1996**, *68*, 1201–1205.
- [261] H. Kessler, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1982**, *21*, 512–523.
- [262] V. H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–544.
- [263] K. Wüthrich, *Angew. Chemie* **2003**, *115*, 3462–3486.
- [264] M. Saunders, A. Wishnia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1958**, *70*, 870–874.
- [265] A. Kowalsky, *Nucl. Magn. Reson.* **1962**, *237*, 1807–1819.
- [266] G. D. Rose, P. J. Fleming, J. R. Banavar, A. Maritan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 16623–16633.
- [267] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647–1651.
- [268] D. S. Wishart, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *58*, 62–87.
- [269] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661–665.
- [270] V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *102*, 241–245.
- [271] D. I. Hoult, *J. Magn. Reson.* **1976**, *21*, 337–347.
- [272] S. Fischer, A. Geyer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 3849–3853.
- [273] S. J. Russell, T. Blandl, N. J. Skelton, A. G. Cochran, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 388–395.
- [274] M. Dhanasekaran, O. Prakash, Y. X. Gong, P. W. Baures, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2071–2082.
- [275] T. Asakura, K. Taoka, M. Demura, M. P. Williamson, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 227–236.
- [276] K. Gunasekaran, L. Gomathi, C. Ramakrishnan, J. Chandrasekhar, P. Balaram, *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 1505–1516.
- [277] N. J. Baxter, M. P. Williamson, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 359–369.
- [278] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–15.
- [279] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc* **1963**, *85*, 2870–2871.
- [280] S. Fischer, *β -hairpin-Peptide zur Erkennung von Antikörpern gegen rheumatoide Arthritis*, Philipps-Universität Marburg, Marburg, **2015**.
- [281] H. Rehm, *Der Experimentator - Proteinbiochemie/Proteomics*, Elsevier GmbH, München, **2006**.
- [282] A. Schrimpf, Variation des Ladungsmusters von peptidischen Rheuma-Antigenen, Philipps-Universität Marburg, **2014**.

- [283] A. Vannini, K. Cheung, M. Fusconi, J. Stammen-Vogelzangs, J. P. H. Drenth, A. C. Dall'Aglio, F. B. Bianchi, L. E. Bakker-Jonges, W. J. van Venrooij, G. J. M. Pruijn, et al., *Ann. Rheum. Dis.* **2007**, *66*, 511–6.
- [284] P. Kakumanu, H. Yamagata, E. S. Sobel, W. H. Reeves, E. K. L. Chan, M. Satoh, *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 1576–1581.
- [285] E. Girbal-Neuhauser, J.-J. Durieux, P. Dalbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessière, C. Jolivet-Reynaud, M. Jolivet, et al., *J. Immunol* **1999**, *162*, 585–594.
- [286] N. H. Trier, C. E. Dam, D. T. Olsen, P. R. Hansen, G. Houen, *PLoS One* **2015**, *10*, e0144707.
- [287] P. Ghosh, A. U. Mushtaq, S. Durani, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 3242.
- [288] B. Goyal, K. Patel, K. R. Srivastava, S. Durani, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 1–9.
- [289] A. Schrimpf, A. Geyer, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2129–2132.
- [290] J. Grünewald, S. A. Sieber, C. Mahlert, U. Linne, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 17025–17031.
- [291] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2876–2890.
- [292] A. Ioan-Facsinay, H. El-Bannoudi, H. U. Scherer, D. van der Woude, H. A. Ménard, M. Lora, L. A. Trouw, T. W. J. Huizinga, R. E. M. Toes, *Ann. Rheum. Dis.* **2011**, *70*, 188–193.
- [293] R. Bessalle, A. Kapitkovsky, A. Gorea, I. Shalit, M. Fridkin, *FEBS Lett.* **1990**, *274*, 151–155.
- [294] M. Nomizu, A. Utani, N. Shiraishi, M. C. Kibbey, Y. Yamada, P. P. Roller, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 14118–14121.
- [295] D. H. Cribbs, C. J. Pike, S. L. Weinstein, P. Velazquez, C. W. Cotman, *Biochemistry* **1997**, *272*, 7431–7436.
- [296] M. G. Ryadnov, O. V. Degtyareva, I. A. Kashparov, Y. V. Mitin, *Peptides* **2002**, *23*, 1869–1871.
- [297] T. N. M. Schumacher, L. M. Mayr, D. L. Minor Jr., M. A. Milhollen, M. W. Burgess, P. S. Kim, *Science* **1996**, *271*, 1854–1856.
- [298] K. Wiesehan, D. Willbold, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 811–815.
- [299] B. D. Welch, A. P. VanDemark, A. Heroux, C. P. Hill, M. S. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 16828–16833.
- [300] S. A. Funke, D. Willbold, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 783–786.

- [301] A. Verdoliva, F. Pannone, M. Rossi, S. Catello, V. Manfredi, *J. Immunol. Methods* **2002**, *271*, 77–88.
- [302] S. Fischer, M. Lamping, M. Gold, Y. Röttger, D. Brödje, R. Dodel, R. Frantz, M. A. Mraheil, T. Chakraborty, A. Geyer, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 603–608.
- [303] T. Nakamura, H. Furunaka, T. Miyata, F. Tokunaga, T. Muta, S. Iwanaga, M. Niwa, T. Takao, Y. Shimonishi, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 16709–16713.
- [304] J. L. Arolas, F. X. Aviles, J. Y. Chang, S. Ventura, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 292–301.
- [305] A. C. Gibbs, L. H. Kondejewski, W. Gronwald, A. M. Nip, R. S. Hodges, B. D. Sykes, D. S. Wishart, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 284–288.
- [306] H. E. Auer, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3003–3011.
- [307] R. W. Woody, *Eur. Biophys. J.* **1994**, *23*, 253–262.
- [308] E. Peggion, A. Cosani, A. S. Verdini, A. Del Pra, M. Mammi, *Biopolymers* **1968**, *6*, 1477–1486.
- [309] K. M. Makwana, R. Mahalakshmi, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 5376–5385.
- [310] E. James Milner-White, R. Poet, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 189–192.
- [311] B. L. Sibanda, T. L. Blundell, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1989**, *206*, 759–777.
- [312] R. B. Fenwick, L. Orellana, S. Esteban-Martín, M. Orozco, X. Salvatella, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–9.
- [313] W. Blokzijl, J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1610–1648.
- [314] C. N. Pace, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 29–35.
- [315] Y. A. Bara, A. Friedrich, H. Kessler, M. Molter, *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 1045–1057.
- [316] I. K. Voets, W. A. Cruz, C. Moitzi, P. Lindner, E. P. G. Arêas, P. Schurtenberger, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 11875–11883.
- [317] K. Jeanne Dit Fouque, C. Afonso, S. Zirah, J. D. Hegemann, M. Zimmermann, M. A. Marahiel, S. Rebuffat, H. Lavanant, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1166–1172.
- [318] K. J. D. Fouque, H. Lavanant, S. Zirah, J. D. Hegemann, M. Zimmermann, M. A. Marahiel, S. Rebuffat, C. Afonso, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28*, 315–322.
- [319] E. A. Mason, E. W. McDaniel, *Transport Properties of Ions in Gases*, Wiley, New York, **1998**.
- [320] M. F. Bush, I. D. G. Campuzano, C. V. Robinson, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7124–7130.
- [321] N. Carulla, C. Woodward, G. Barany, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7927–37.
- [322] X.-Y. Meng, Y. Xu, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 1–11.

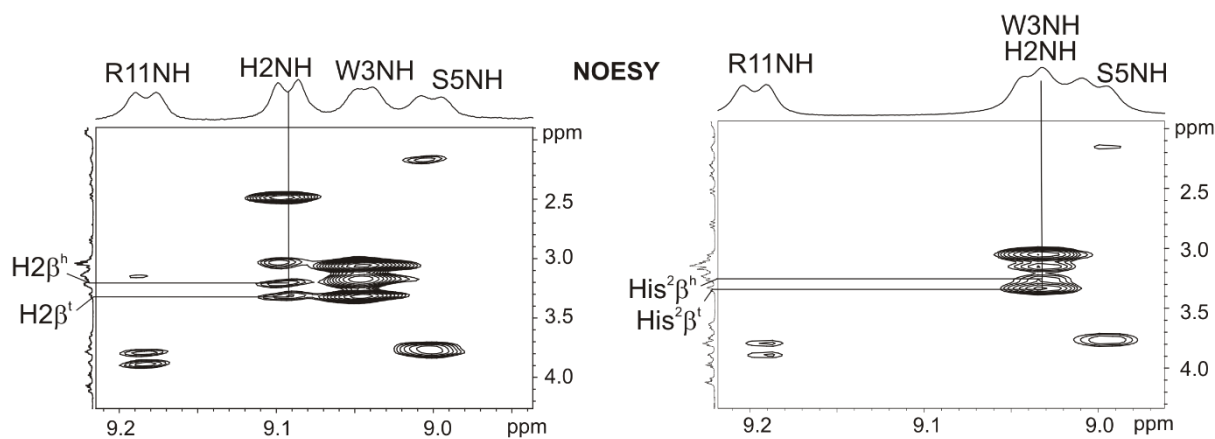
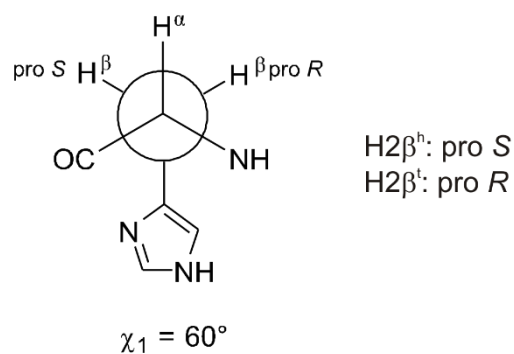
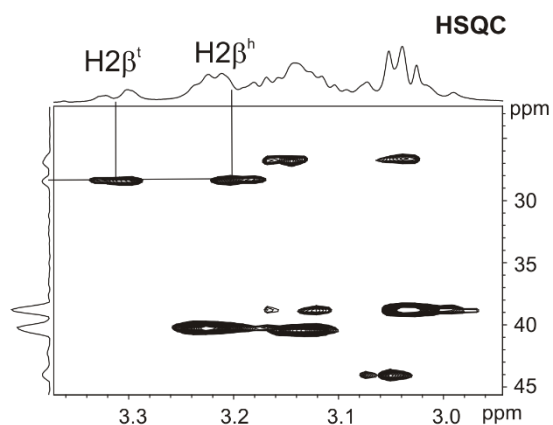
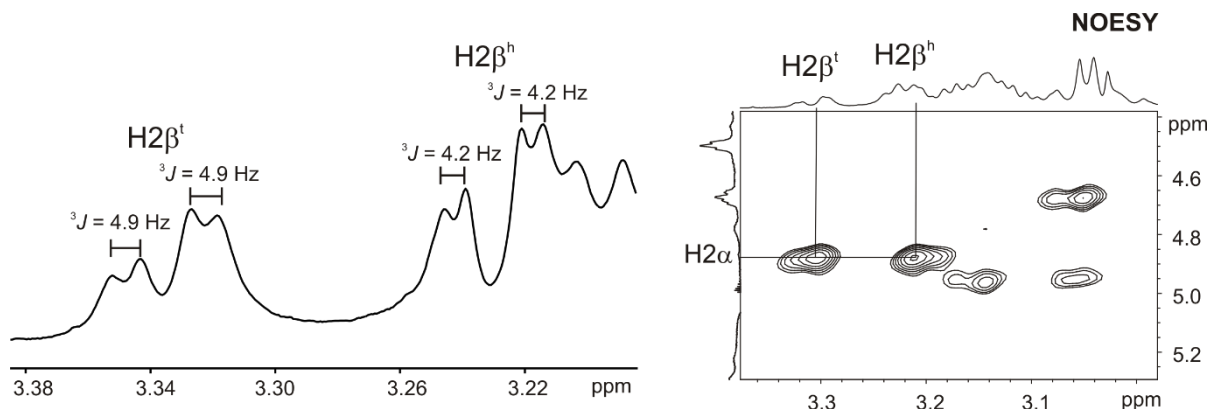
- [323] S. Jones, J. M. Thornton, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, 63, 31–65.
- [324] J. D. Klemm, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, 16, 569–592.
- [325] M. H. Ali, B. Imperiali, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5013–5020.
- [326] Z. Sun, R. Lonsdale, L. Wu, G. Li, A. Li, J. Wang, J. Zhou, M. T. Reetz, *ACS Catal.* **2016**, 6, 1590–1597.
- [327] G. Li, H. Zhang, Z. Sun, X. Liu, M. T. Reetz, *ACS Catal.* **2016**, 6, 3679–3687.
- [328] M. Arand, B. M. Hallberg, J. Zou, T. Bergfors, F. Oesch, M. J. Van der Werf, J. A. M. De Bont, T. A. Jones, S. L. Mowbray, *EMBO J.* **2003**, 22, 2583–2592.
- [329] F. Hempel, U. G. Maier, *Microb. Cell Fact.* **2012**, 11, 126.
- [330] K. E. Apt, P. G. Kroth-Pancic, A. R. Grossman, *Mol Gen Genet* **1996**, 252, 572–579.
- [331] F. Hempel, J. Lau, A. Klingl, U. G. Maier, *PLoS One* **2011**, 6, DOI 10.1371/journal.pone.0028424.
- [332] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Boston, MA, **2006**, S. 529–575.
- [333] M. T. Neves-Petersen, S. Klitgaard, T. Pascher, E. Skovsen, T. Polivka, A. Yartsev, V. Sundström, S. B. Petersen, *Biophys. J.* **2009**, 97, 211–226.
- [334] R. M. Abaskharon, F. Gai, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18, 9602–9607.
- [335] J. Hennecke, A. Sillen, M. Huber-Wunderlich, Y. Engelborghs, R. Glockshuber, *Biochemistry* **1997**, 36, 6391–6400.
- [336] I. B. Grishina, R. W. Woody, *Faraday Discuss.* **1994**, 99, 245–262.
- [337] N. H. Andersen, K. A. Olsen, R. M. Fesinmeyer, X. Tan, F. M. Hudson, L. A. Eidenschink, S. R. Farazi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6101–6110.
- [338] S. Frank, R. A. Kammerer, D. Mechling, T. Schulthess, R. Landwehr, J. Bann, Y. Guo, A. Lustig, H. P. Ba, È. Engel, **2001**, 1081–1089.
- [339] S. Frank, S. Boudko, K. Mizuno, T. Schulthess, J. Engel, H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 7747–7750.
- [340] X. Cui, H. S. Nagesha, I. H. Holmes, *J. Virol. Methods* **2003**, 114, 109–112.
- [341] M. Hamzeh-Mivehroud, A. A. Alizadeh, M. B. Morris, W. Bret Church, S. Dastmalchi, *Drug Discov. Today* **2013**, 18, 1144–1157.
- [342] M. Körling, A. Geyer, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2382–2387.
- [343] M. Körling, A. Geyer, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6448–6457.
- [344] H. Uysal, R. Bockermann, K. S. Nandakumar, B. Sehnert, E. Bajtner, A. Engström, G. Serre, H. Burkhardt, M. M. G. M. Thunnissen, R. Holmdahl, *J. Exp. Med.* **2009**, 206, 449–62.

- [345] K. Fujiwara, H. Toda, M. Ikeguchi, P. Chou, G. Fasman, T. Hubbard, B. Ailey, S. Brenner, A. Murzin, C. Chothia, et al., *BMC Struct. Biol.* **2012**, 12, 18.
- [346] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, 6, 1425–1436.
- [347] K. Möhle, M. Gußmann, H. J. Hofmann, *J. Comput. Chem.* **1997**, 18, 1415–1430.
- [348] K.-C. Chou, H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, 79, 7047–7051.
- [349] A. G. Amit, R. A. Mariuzza, S. E. Phillips, R. J. Poljak, *Science* **1986**, 233, 747–753.
- [350] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993.
- [351] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, 44, 98–104.
- [352] J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux, *J. Mol. Biol.* **1965**, 12, 88–118.
- [353] D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, 0, 2015–2022.
- [354] D. Steer, R. Lew, P. Perlmutter, A. Smith, M.-I. Aguilar, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 811–822.
- [355] D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodivers.* **2004**, 1, 1111–1239.
- [356] H. M. Werner, W. S. Horne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 28, 75–82.
- [357] N. B. Maroudas, G. P. Lo, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, D. Seebach, et al., **1999**, 1998–2000.
- [358] I. L. Karle, H. N. Gopi, P. Balaram, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98, 3716–3719.
- [359] R. A. Kirschner, Ribopyranosylierte Peptide als Bausteine für den reversiblen Aufbau von Bisubstrat-Inhibitoren der Proteinkinase A, Philipps-Universität Marburg, Marburg, **2017**.
- [360] N. Braun, T. Risler, in *Medizinische Ther.* (Ed.: J. Schölmerich), Springer, Berlin, Heidelberg, **2005**, S. 185–188.
- [361] HyperChem, Hypercube, Inc., Gainesville, FL, **2000**.
- [362] S. Enck, F. Kopp, M. A. Marahiel, A. Geyer, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2597–2601.
- [363] W. L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, **2008**.

8. Anhang

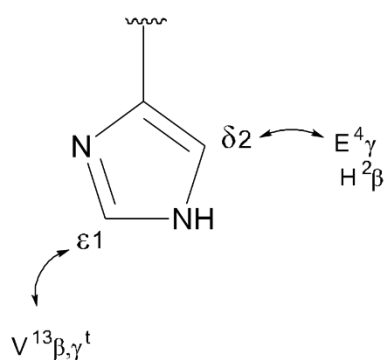
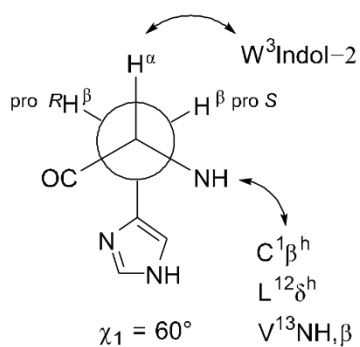
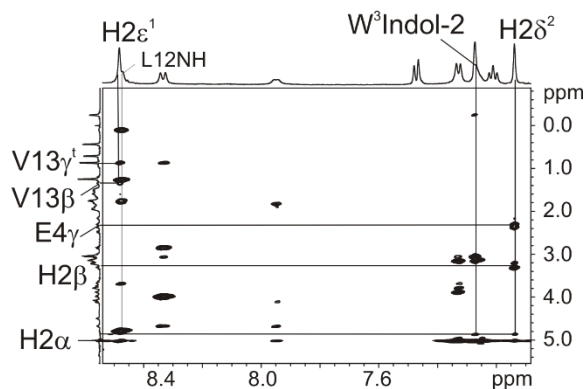
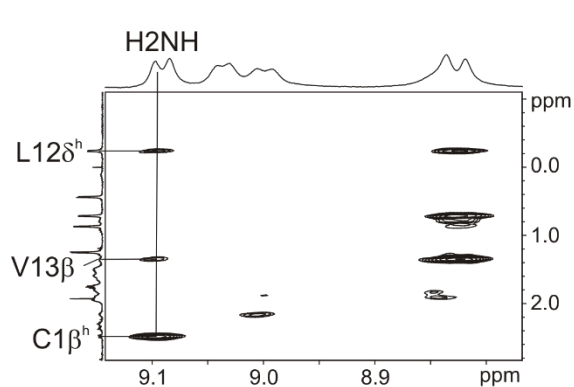
8.1 Seitenkettenrotamere des Referenzpeptids 1

Histidin 2

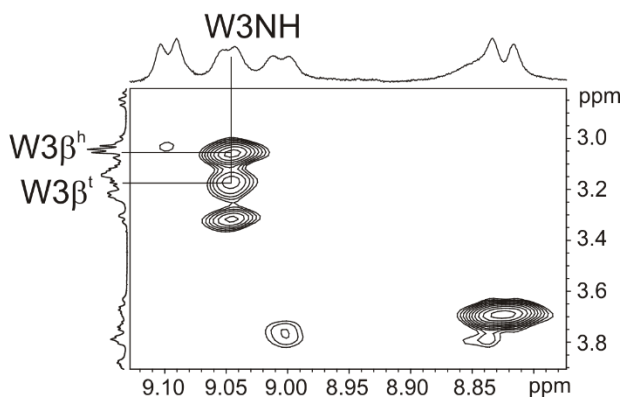
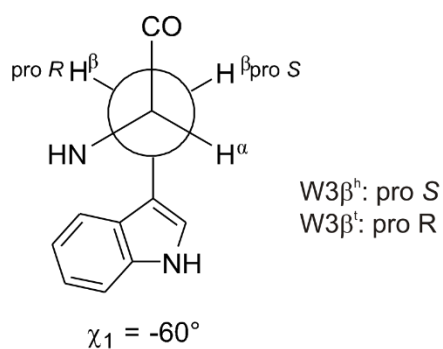
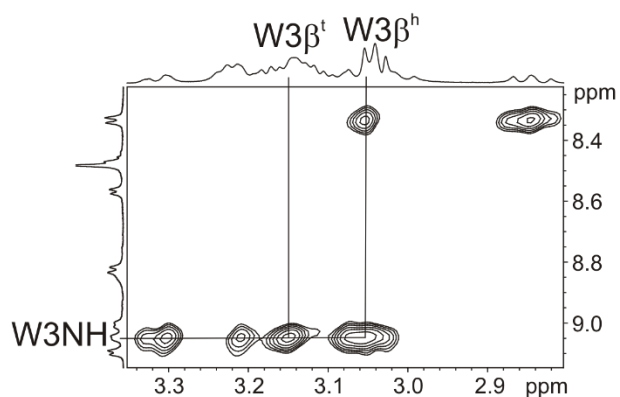
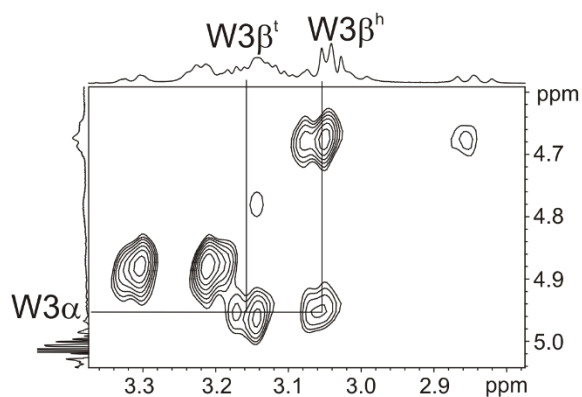


(NOE-Kontakte zwischen $\text{H}\beta$ und NH schwach.
 Prochirale Zuordnung auf dieser Basis nicht möglich)

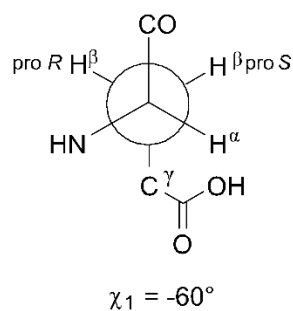
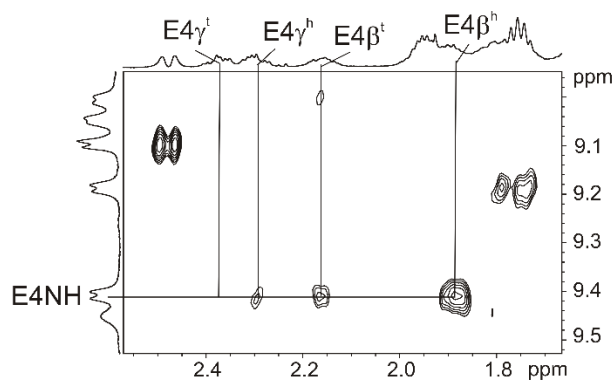
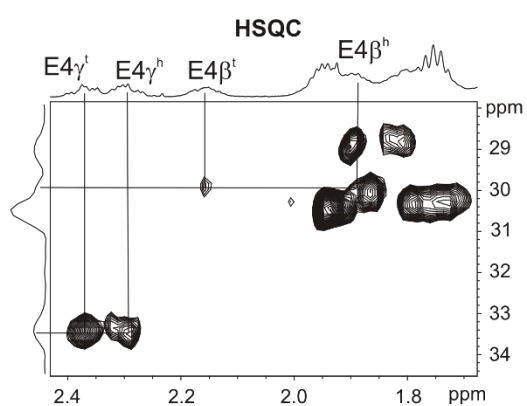
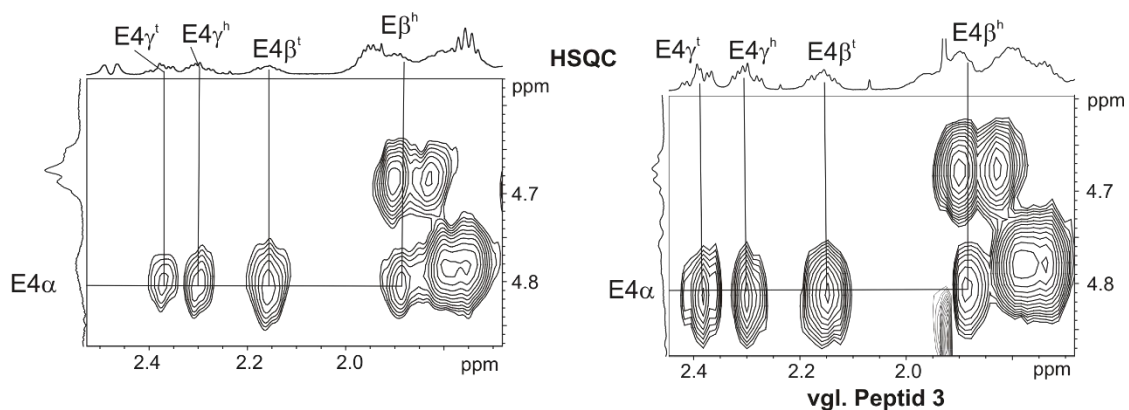
→ vgl. Peptid 3



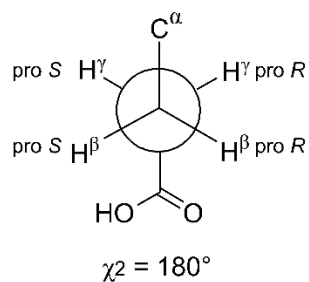
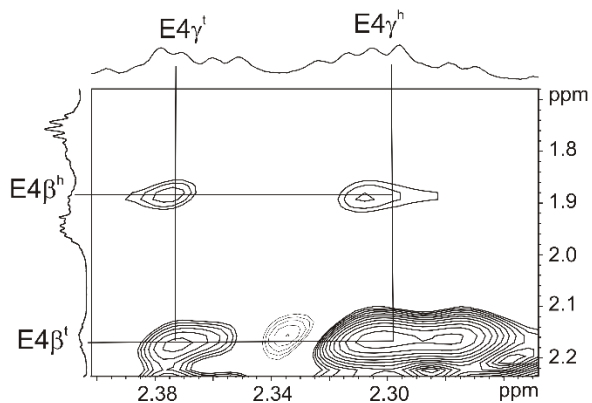
Tryptophan 3



Glutamat 4

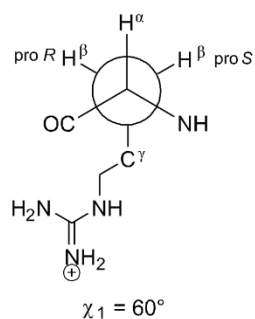
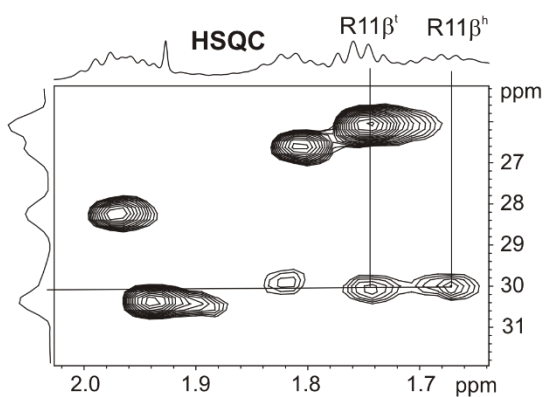
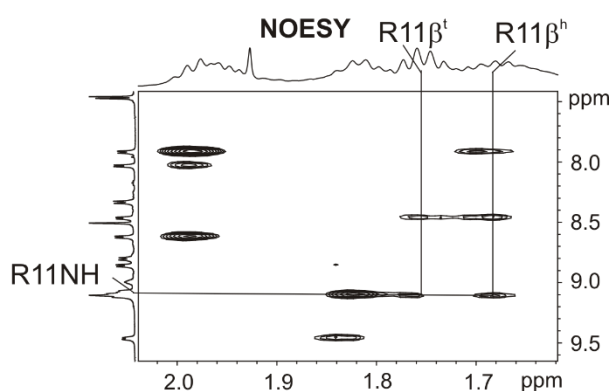
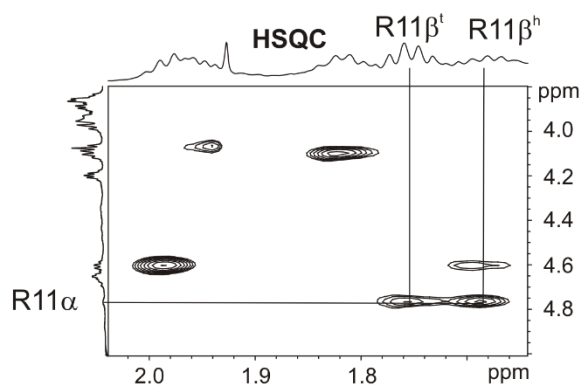
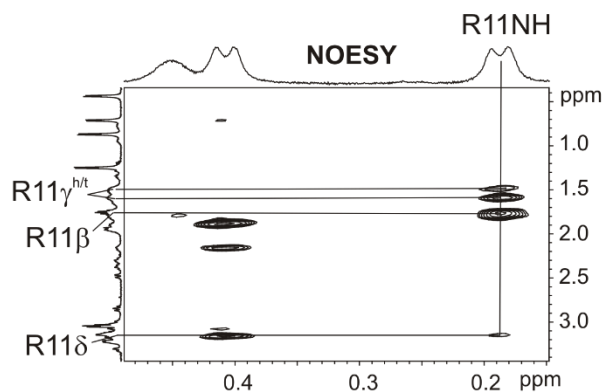


$E4\beta^h$: pro *R*
 $E4\beta^t$: pro *S*



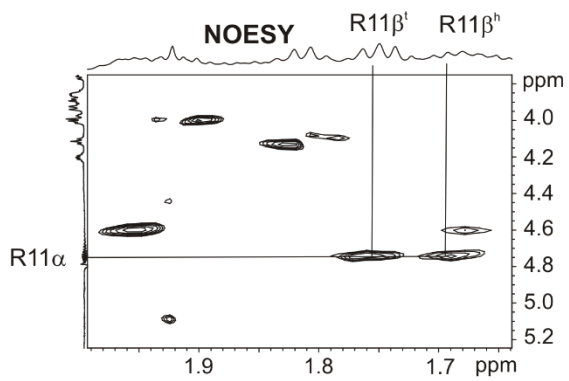
$E4\gamma^h$: pro *R*
 $E4\gamma^t$: pro *S*

Arginin 11

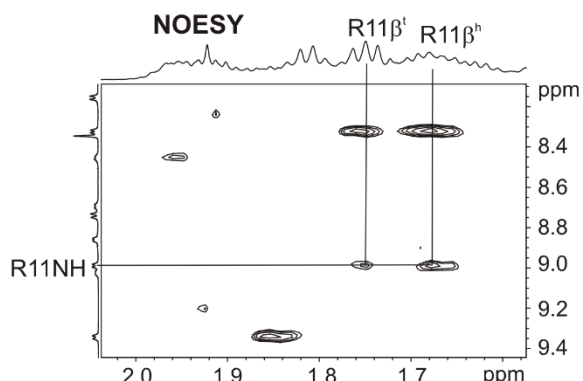


R11β^h: pro S
R11β^t: pro R

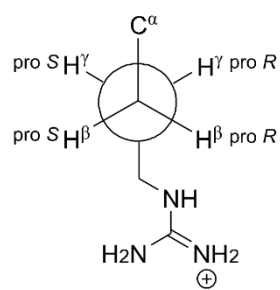
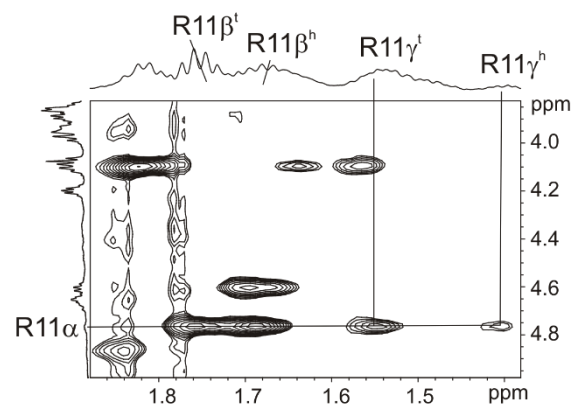
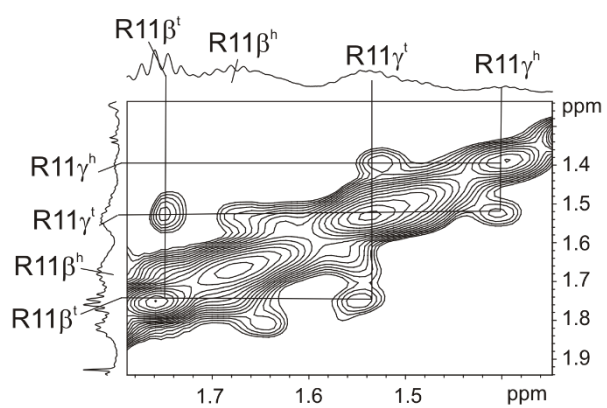
vgl. Peptid 10 (300 K)



vgl. Peptid 10 (280 K)

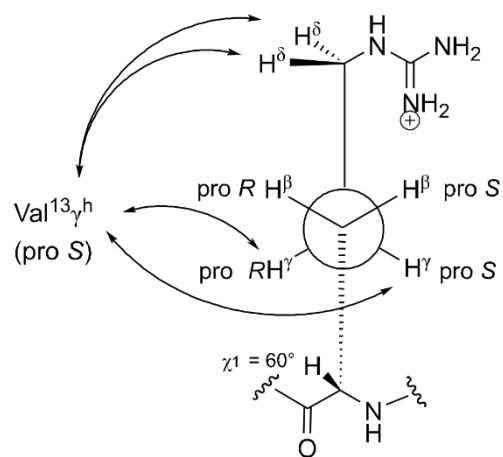
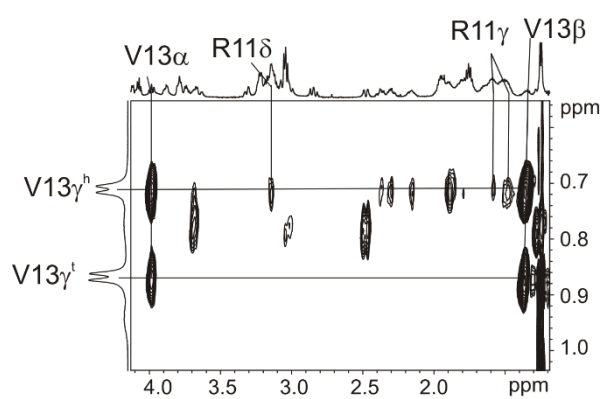
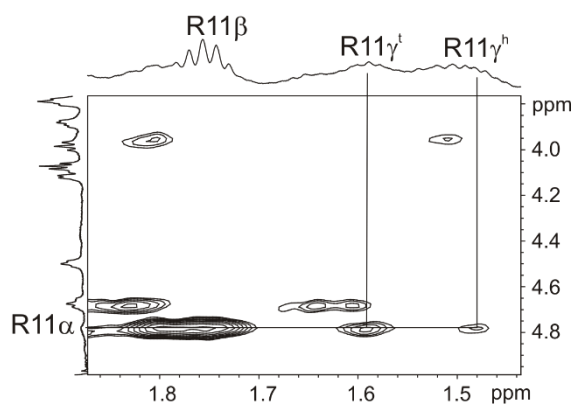


vgl. Peptid 10 (280 K)

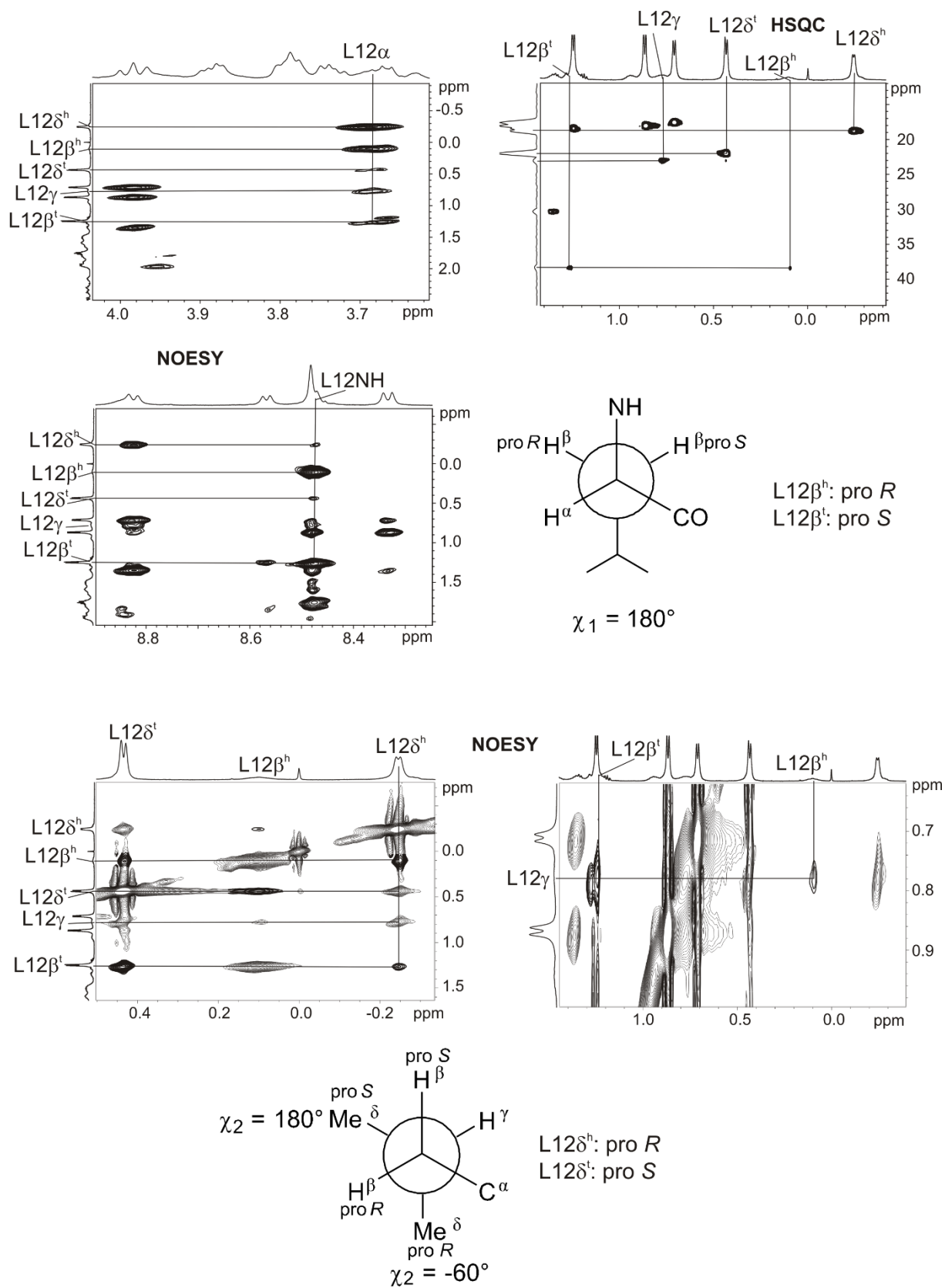


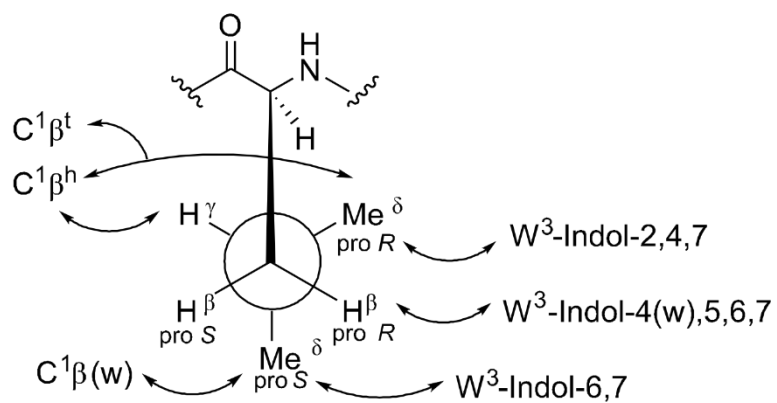
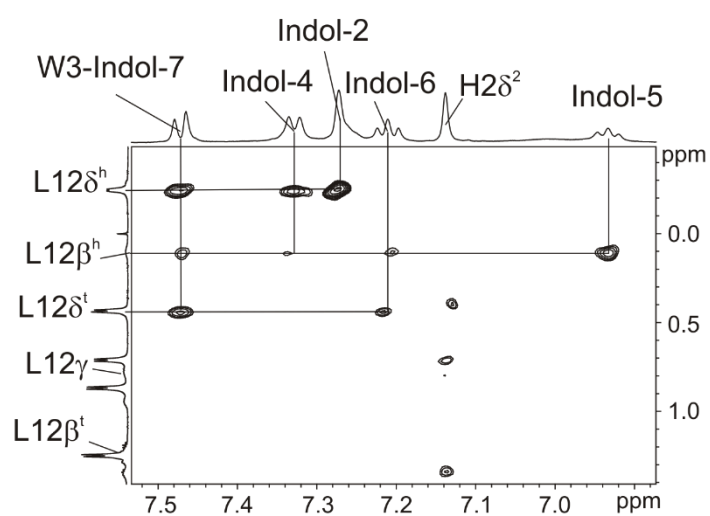
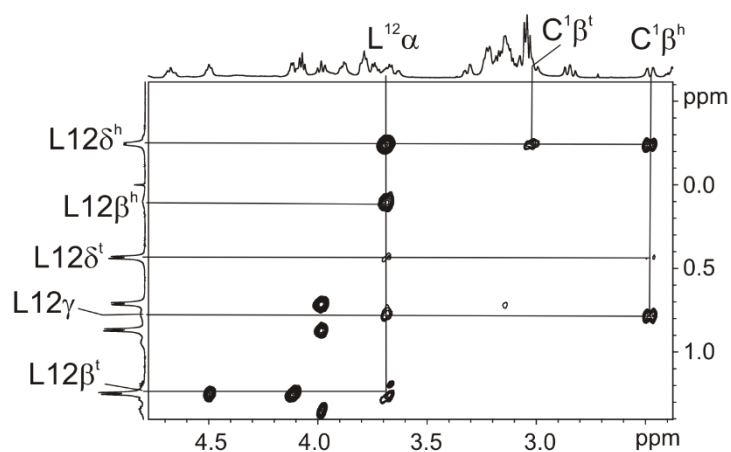
R11γ^h: pro S
R11γ^t: pro R

$\chi_2 = 180^\circ$

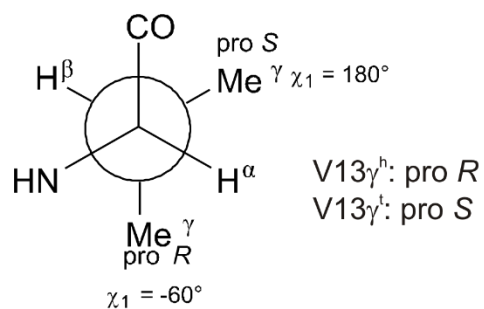
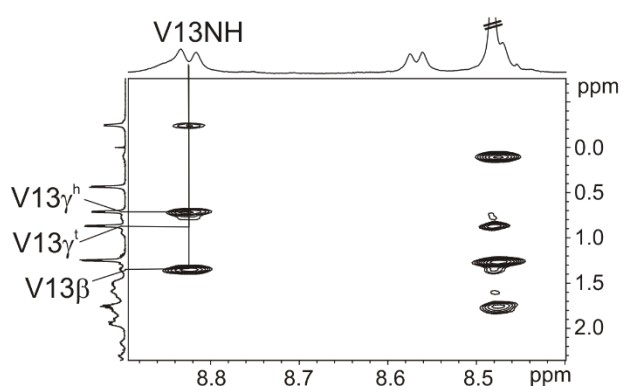
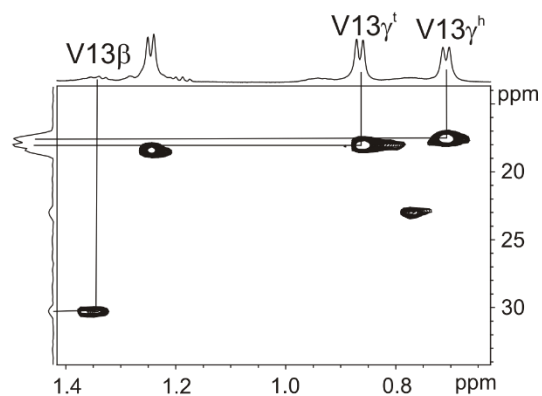
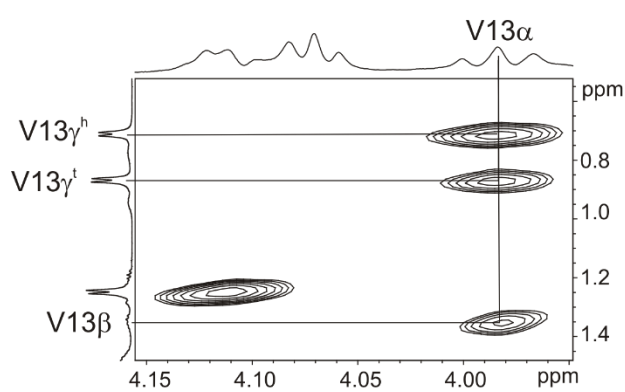
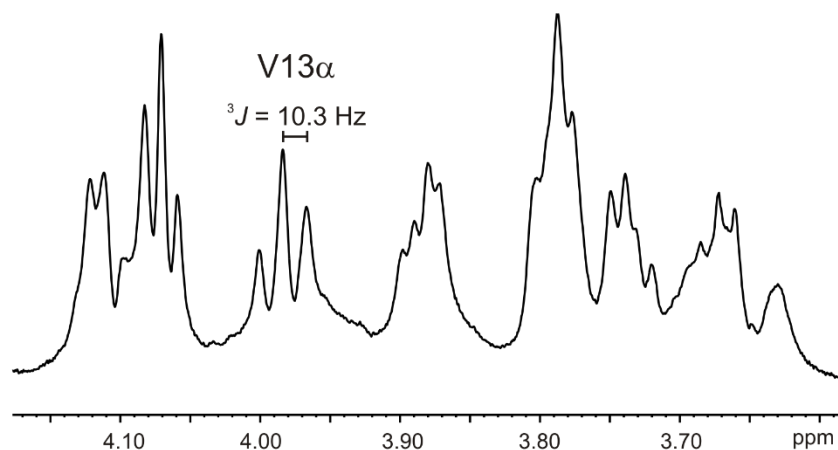


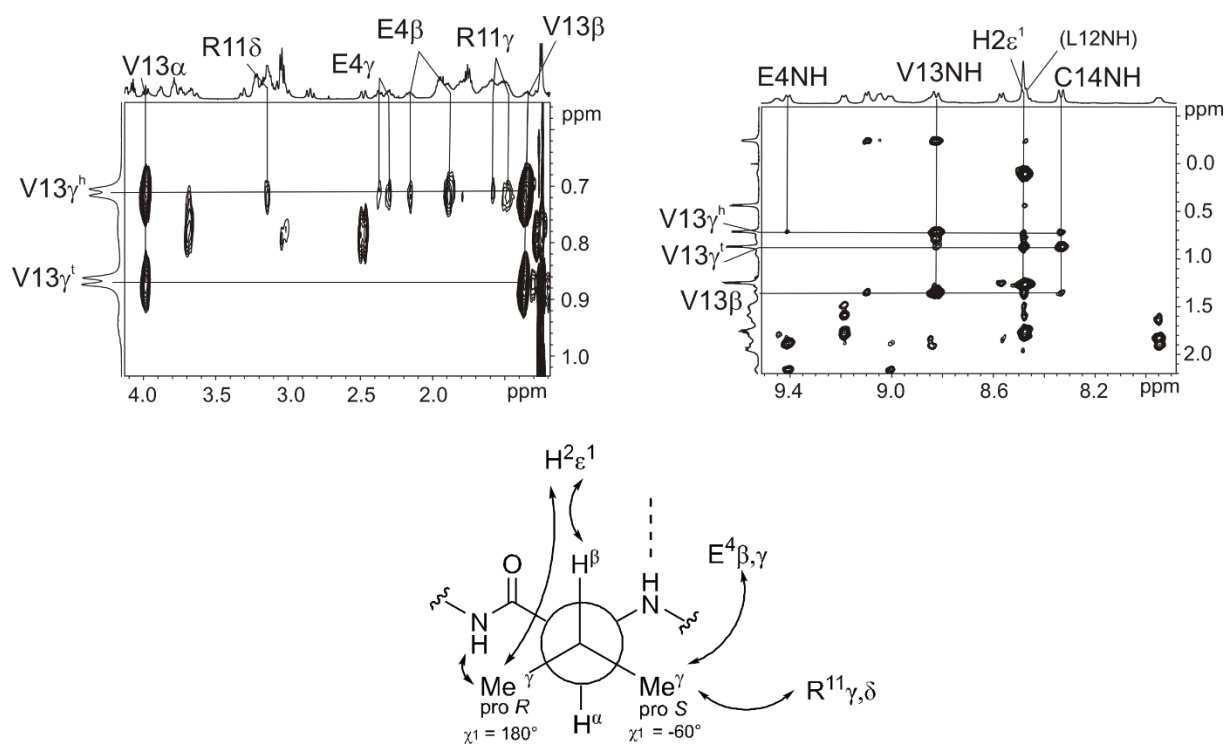
Leucin 12





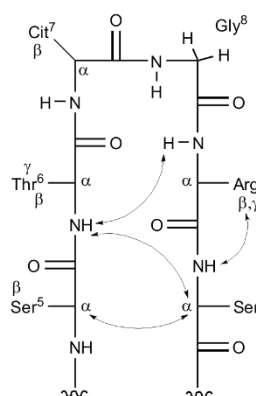
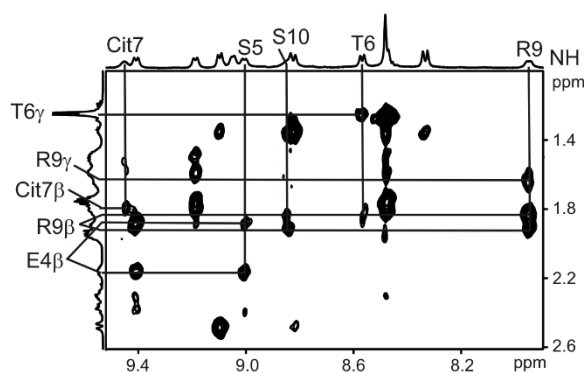
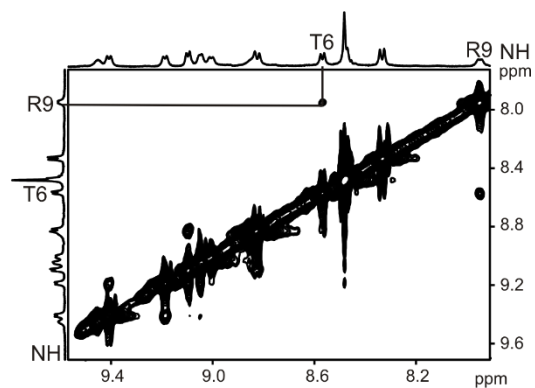
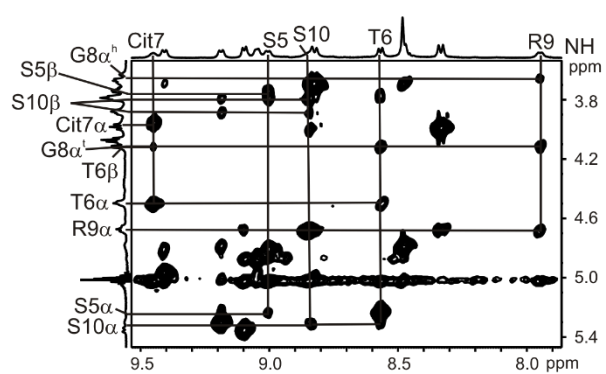
Valin 13



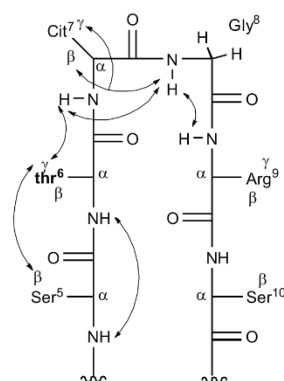
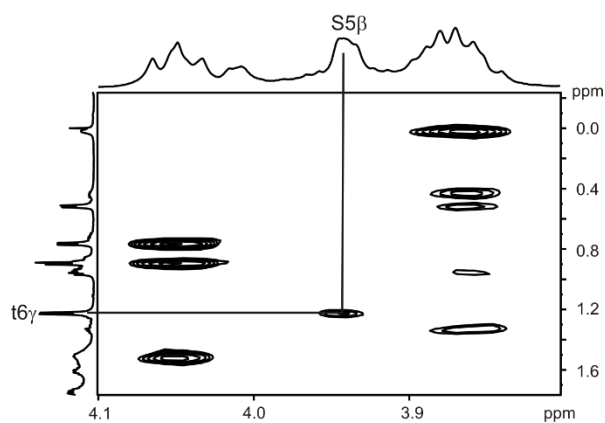
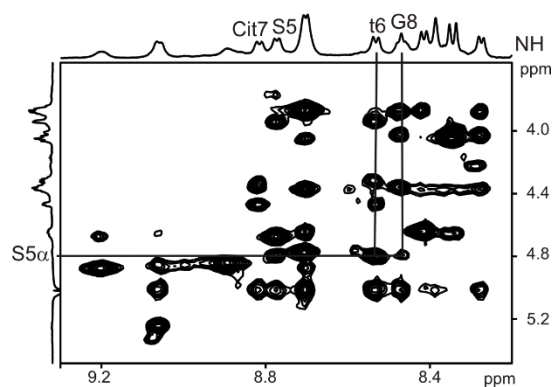
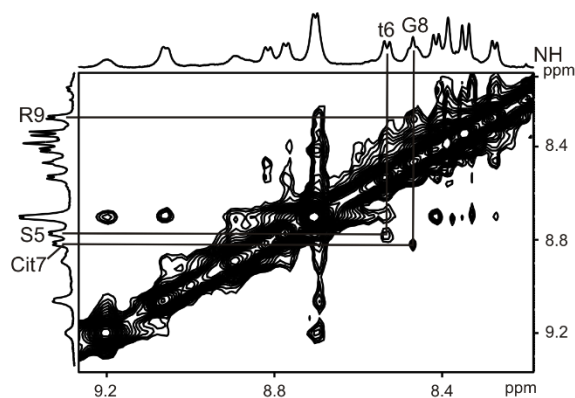


8.2 Turn-NOE-Kontakte

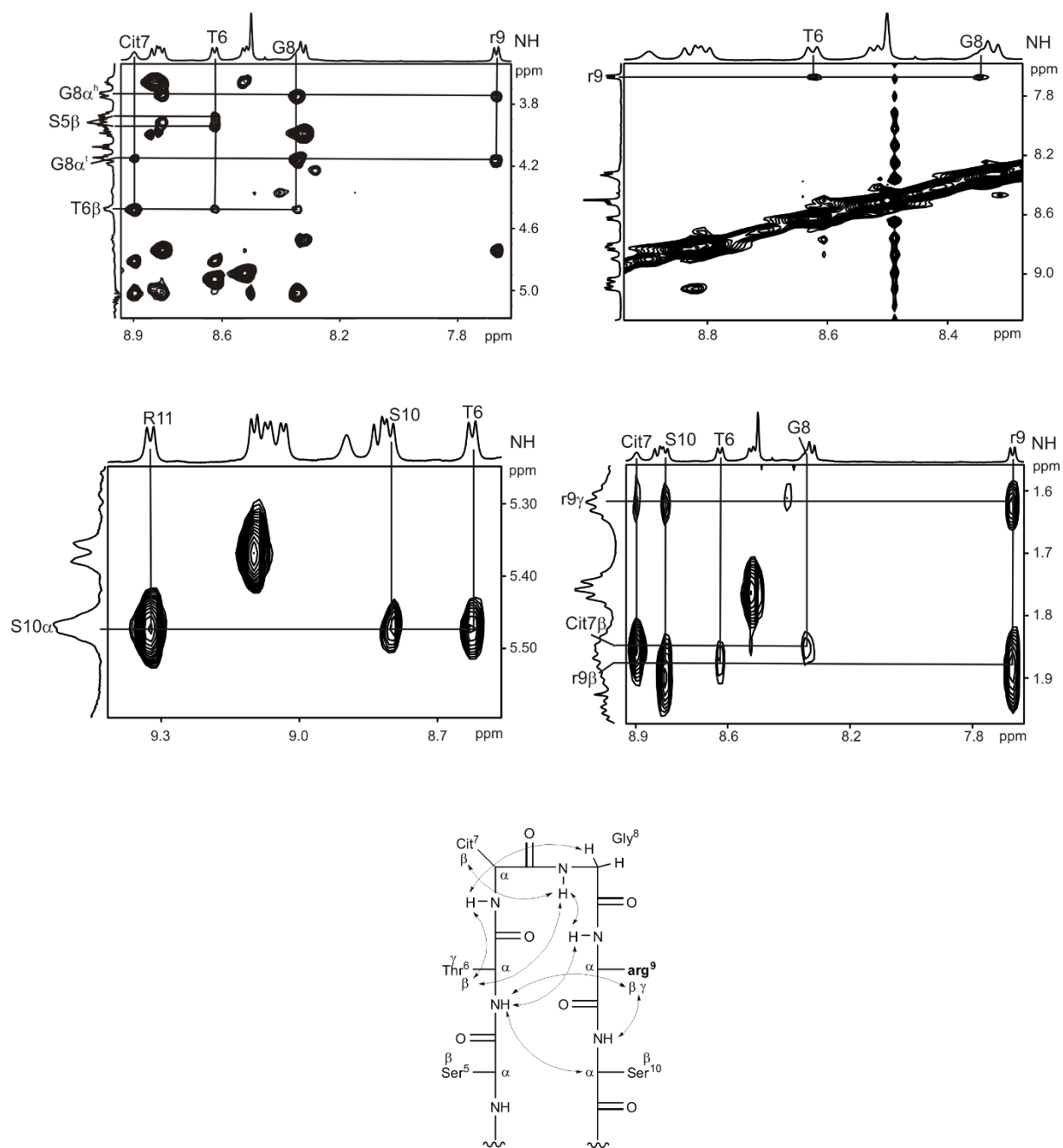
All-L-Peptid 1



Mono-D- Peptid 9 (t6)



Mono-D- Peptid 11 (r9)



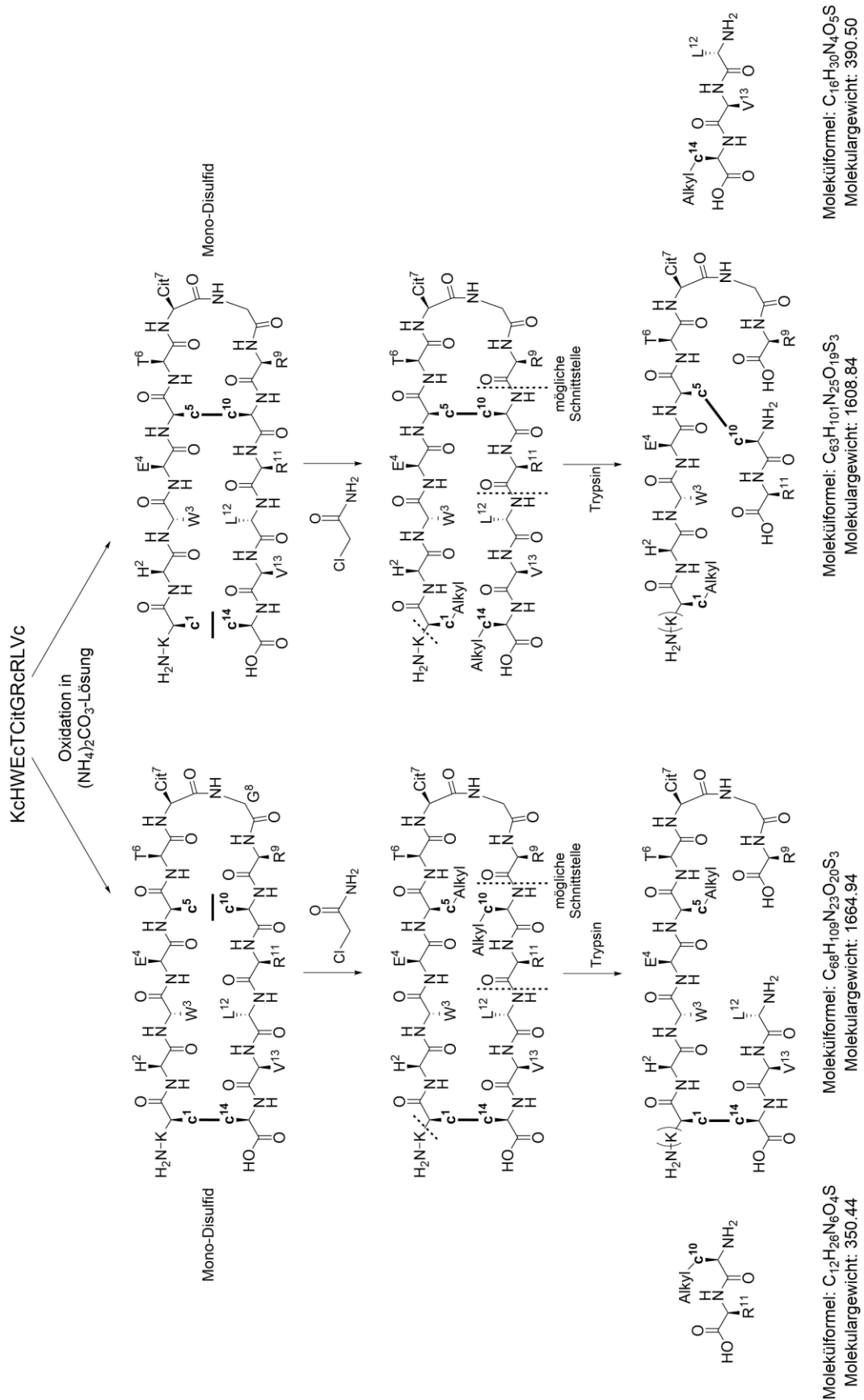
8.3 Alkylierung und anschließender Trypsinverdau von Tetrathiolsequenz 22

Tetrathiolsequenz KcHWEcTCitGRcRLVc **22** wurde einer Luftoxidation in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung ($c_{\text{Peptid}} \approx 1 \text{ mg/mL}$) unterzogen. Die Oxidation wurde mittels HPLC verfolgt. Sobald die Anwesenheit der vermuteten Monodisulfidspezies beobachtet wurde, wurde ein Überschuss (100 eq) an 2-Chloracetamid zugegeben. Nach vollständigem Umsatz des Monodisulfids, angezeigt durch das Verschwinden des entsprechenden Peaks im HPLC-Chromatogramm, wurde die wässrige Lösung gefriergetrocknet.

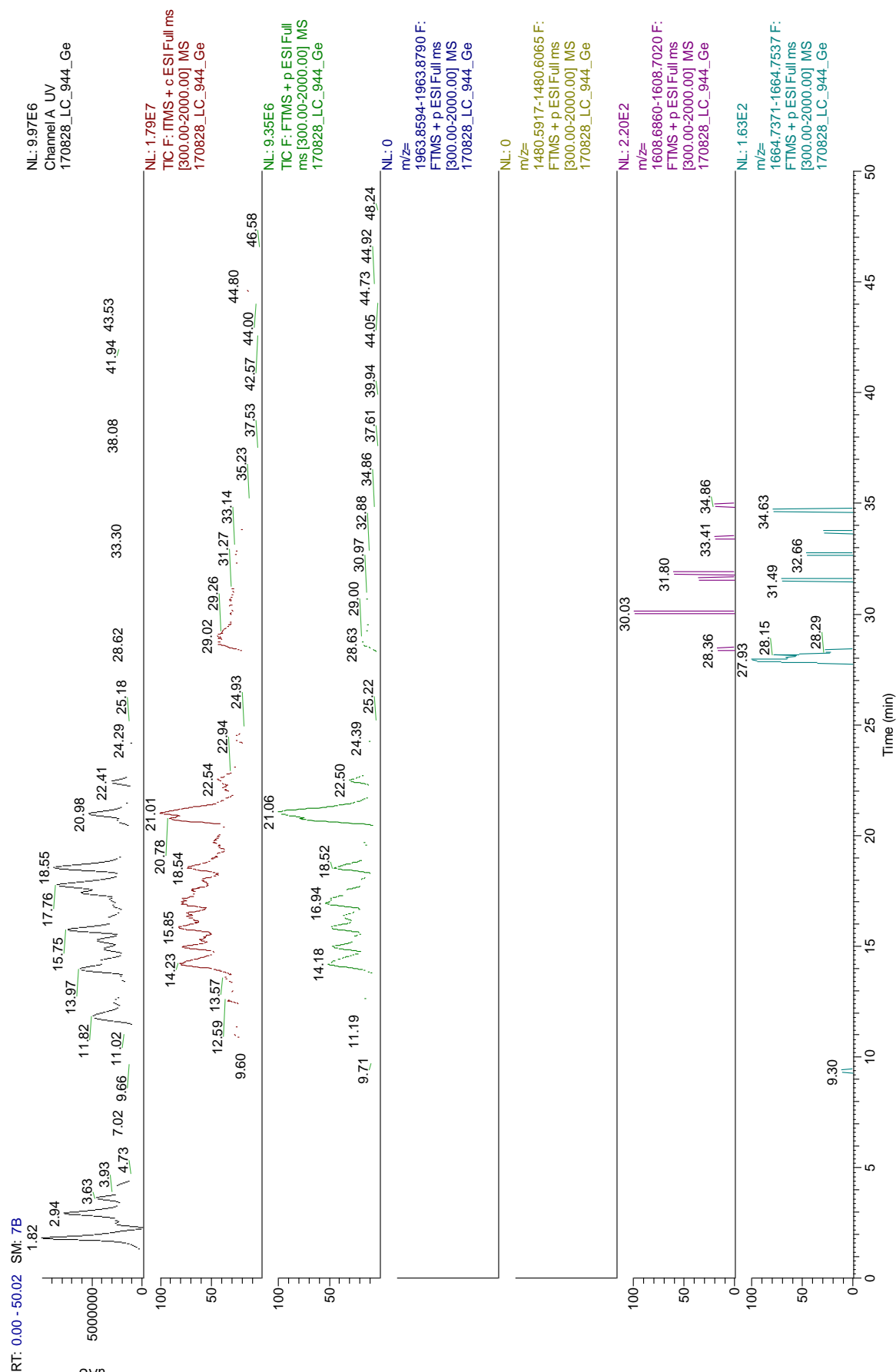
Für den anschließenden tryptischen Verdau wurden wenige Mikrogramm der rohen Peptidmischung in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer (50 mM, pH = 8.0) gelöst und ein Überschuss an Trypsin zugegeben. Nach 5 min bei 37 °C wurde der Verdau durch Addition von 2 μL Ameisensäure gestoppt. Die Lösung wurde direkt anschließend einer LC-MS-Messung unterzogen.

Es wurde nach Fragmenten gesucht, die eine intakte Disulfidbrücke, aber gespaltene Amidbindungen aufwiesen (siehe Abbildung unten). Die erste Disulfidbrücke kann zwischen c1-c14 (linker Pfad) oder c5-c10 (rechter Pfad) gebildet werden, sodass die unreaktierten Thiole mittels des Alkylierungsreagenzes Chloracetamid abgefangen werden können. Diese Pfade erlauben dementsprechend nur definierte Kombinationen von Fragmenten, die durch Trypsinverdau gebildet werden (die relevanten Fragmente sind jeweils gezeigt). Bei LC-MS-Messungen konnte nur das kleinere Fragment ($M = 390.50 \text{ g/mol}$), das aus dem Trypsinabbau des Monodisulfids mit c5-c10 (rechter Pfad) hervorgeht, in relevanten Mengen detektiert werden. Dementsprechend konnte davon ausgegangen werden, dass die zentrale Disulfidbrücke zwischen Position 5 und 10 als erste ausgebildet wird.

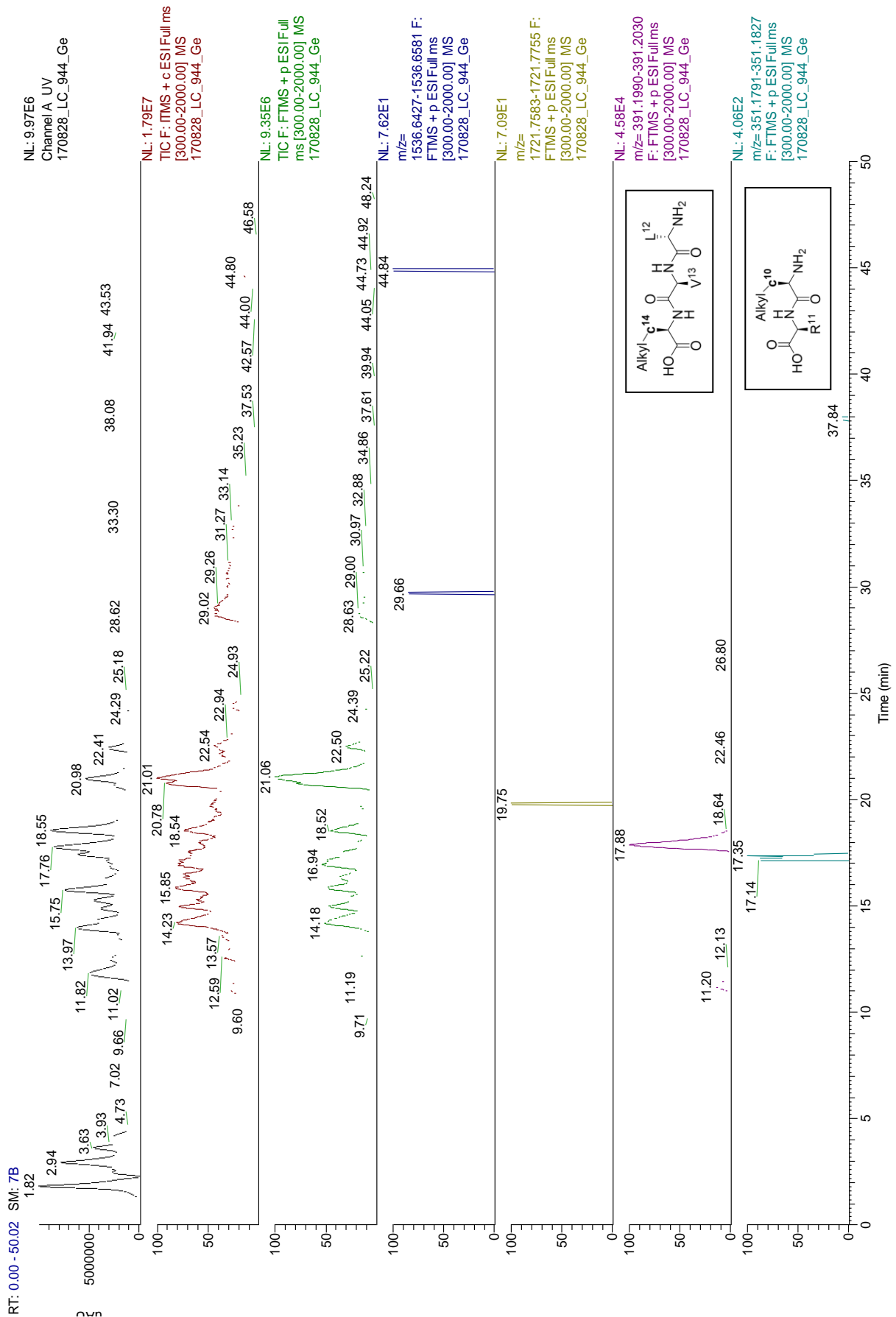
Pfade der Alkylierung und Fragmentierung von Tetrathiolsequenz 22



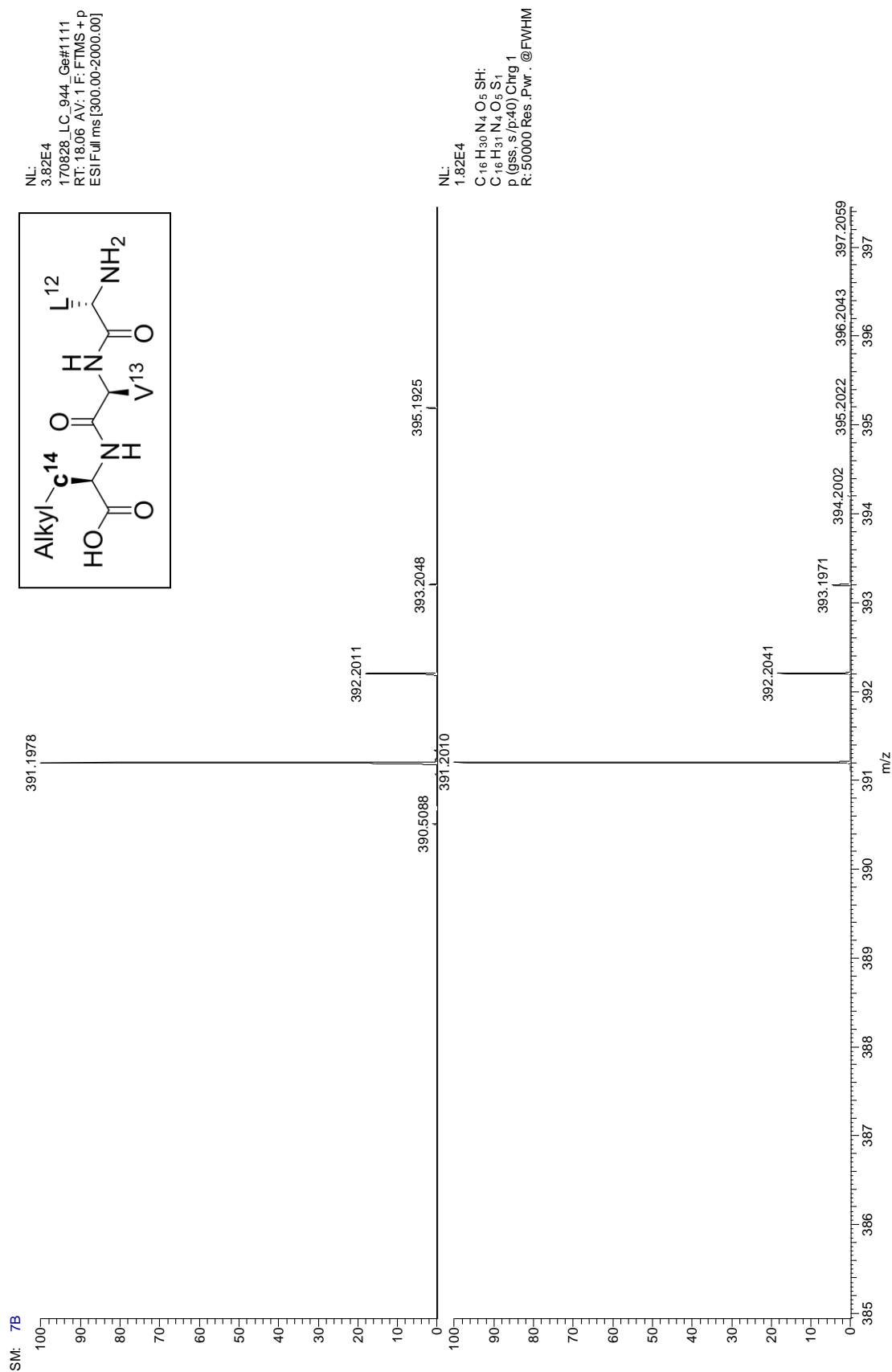
HPLC-Chromatogramme mit UV- (ganz oben) und Massendetektion 1



HPLC-Chromatogramme mit UV- (ganz oben) und Massendetektion 2

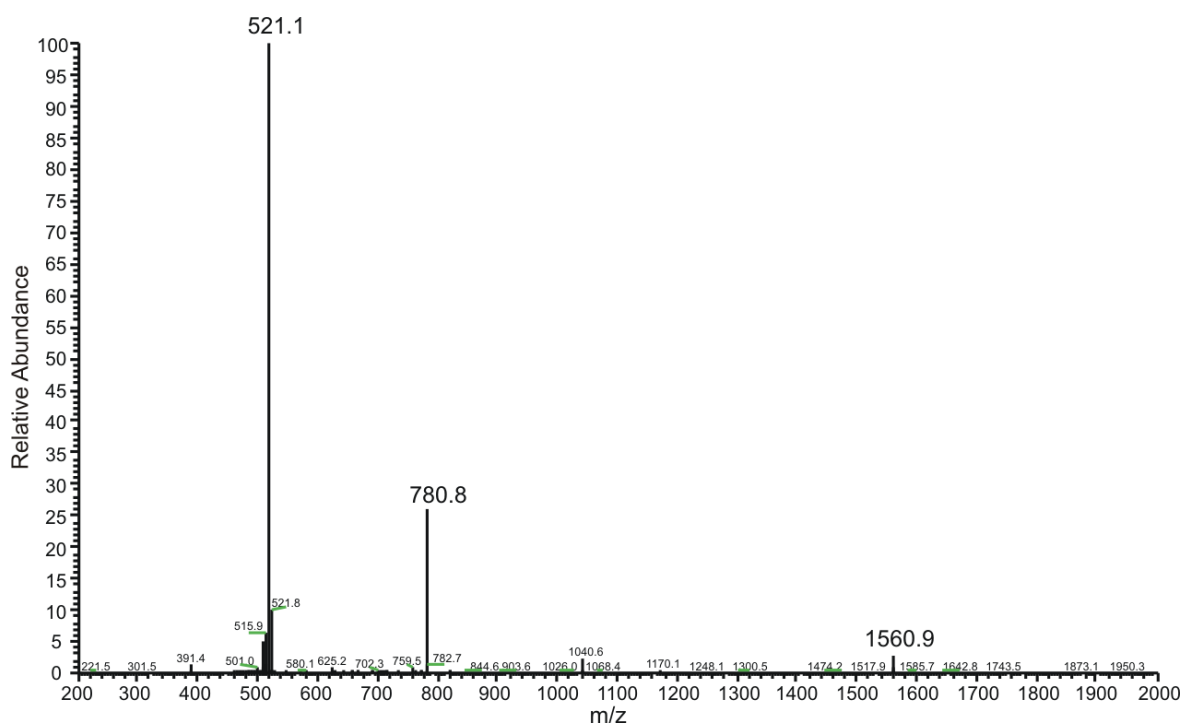


HR-Massenspektrum des angezeigten Fragments, das beim Trypsinverdau des Monodisulfids mit c5-c10 entsteht

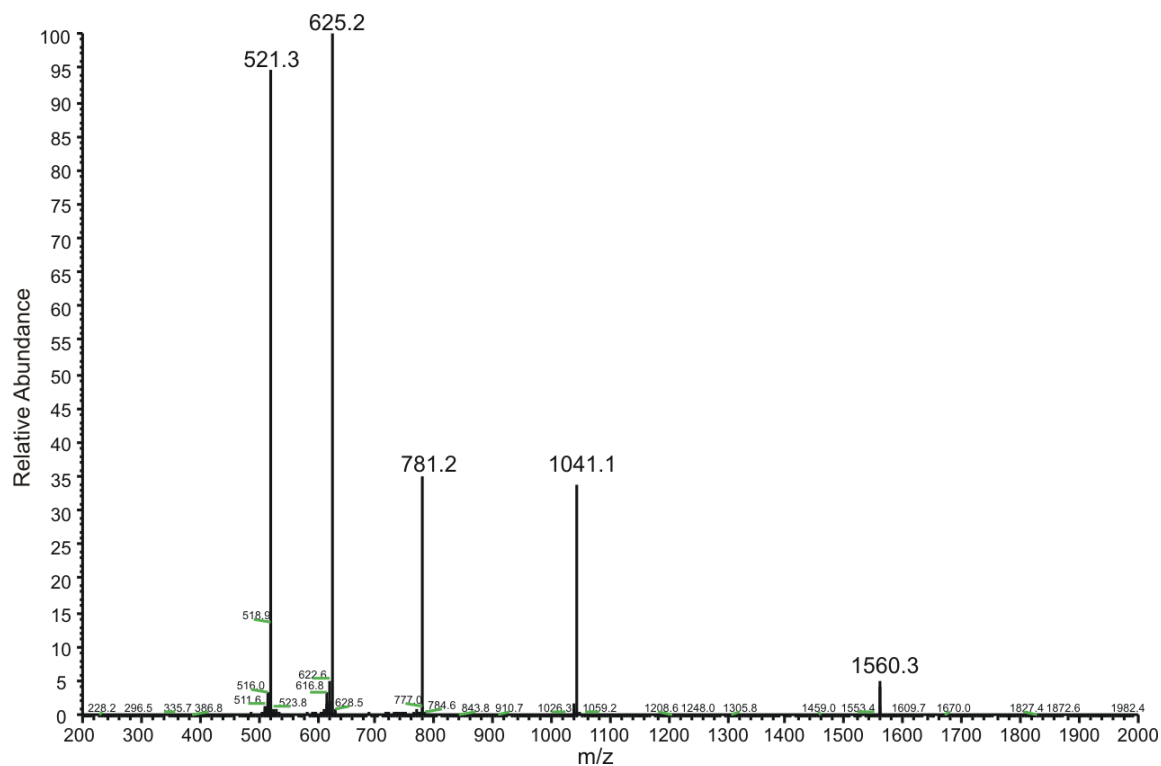


8.4 Massenspektren der Monomere und Dimere aus 12er-Sequenzen

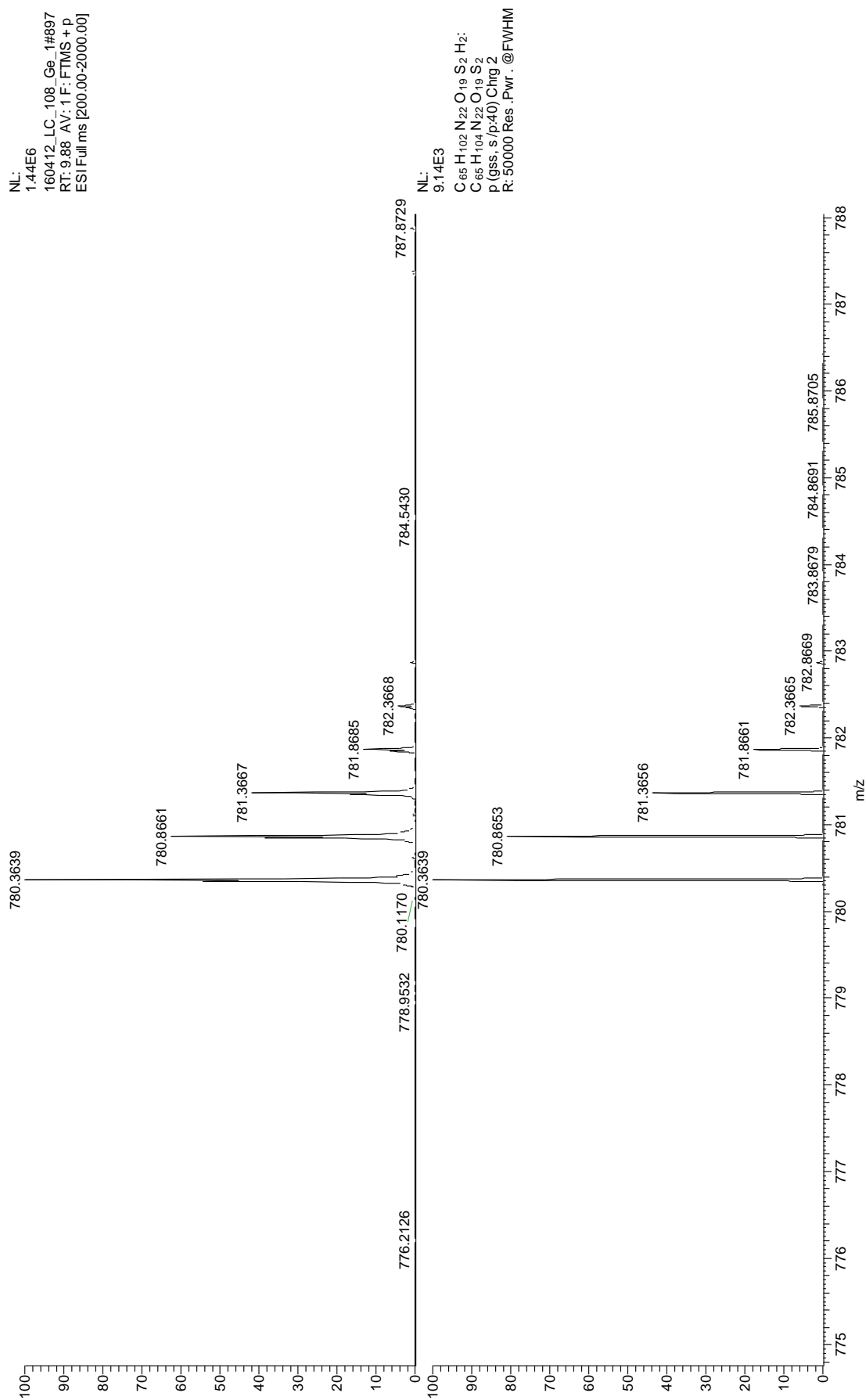
Massenspektrum des Monomers 24m



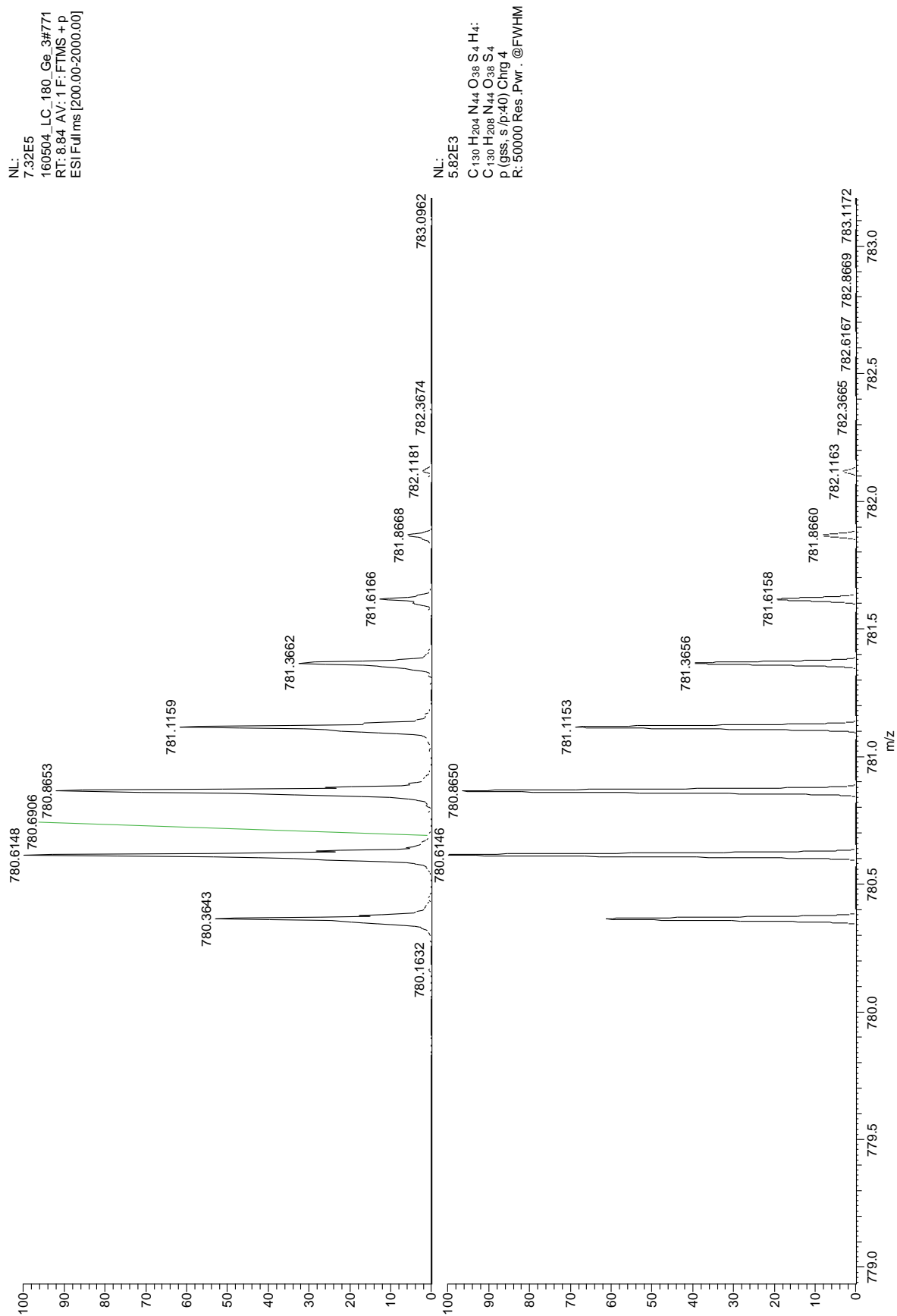
Massenspektrum des Dimers 24d



HR-Massenspektrum des Monomers 24m

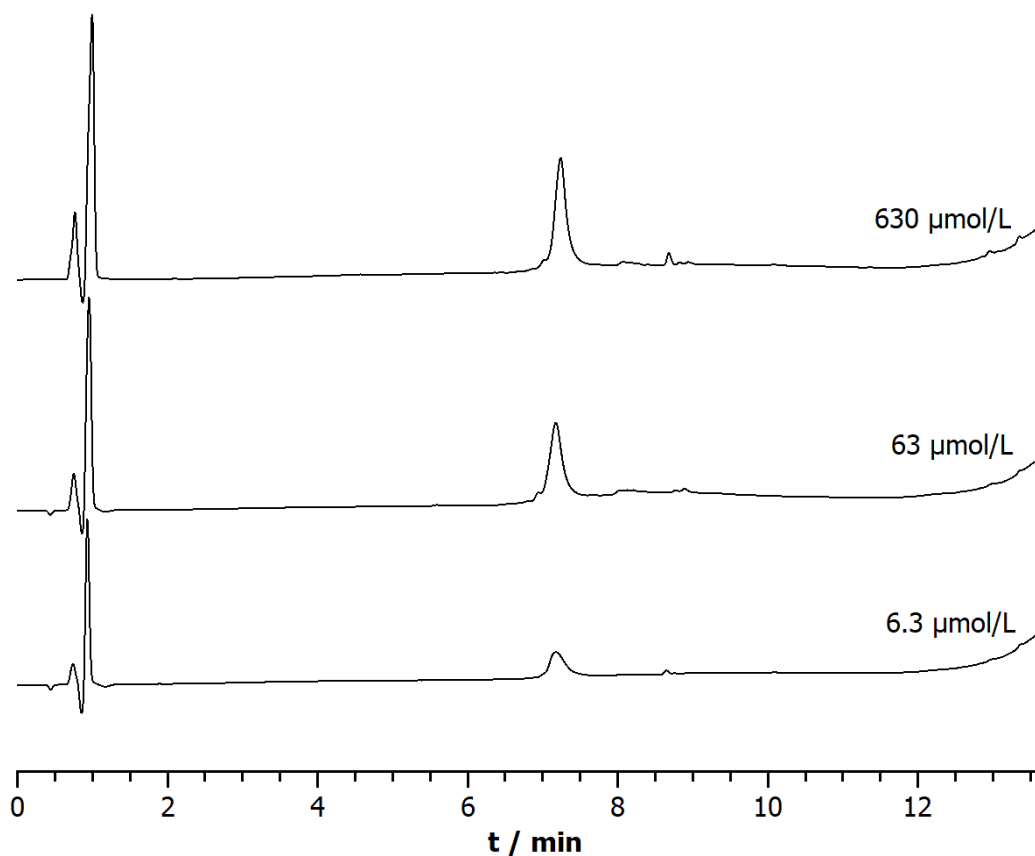


HR-Massenspektrum des Dimers 24d



8.5 Konzentrationsabhängige Dimerisierung der Tetrathiolsequenz 28

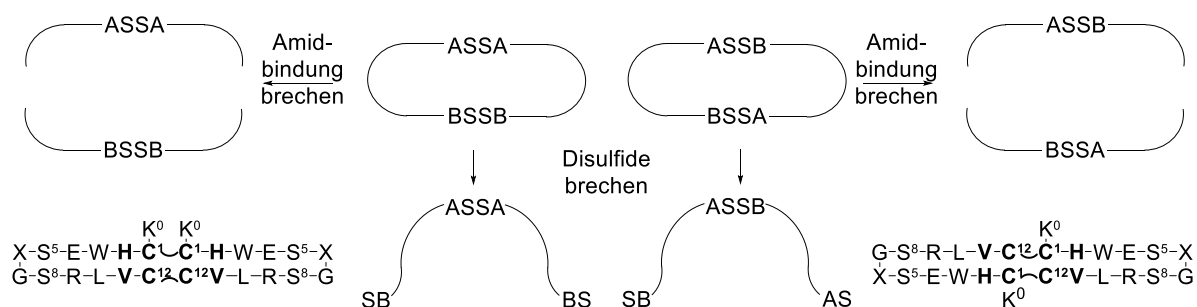
Chromatogramme des Rohpeptids **28d** nach Luftoxidation in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung (pH = 7.4, 50 mM) des Tetrathiol-Vorläufers **28**. Die jeweiligen Konzentrationen sind am Ende des jeweiligen Chromatogramms angegeben. Selbst bei hoher Verdünnung wird die entropisch ungünstigere Dimerisierung beobachtet.



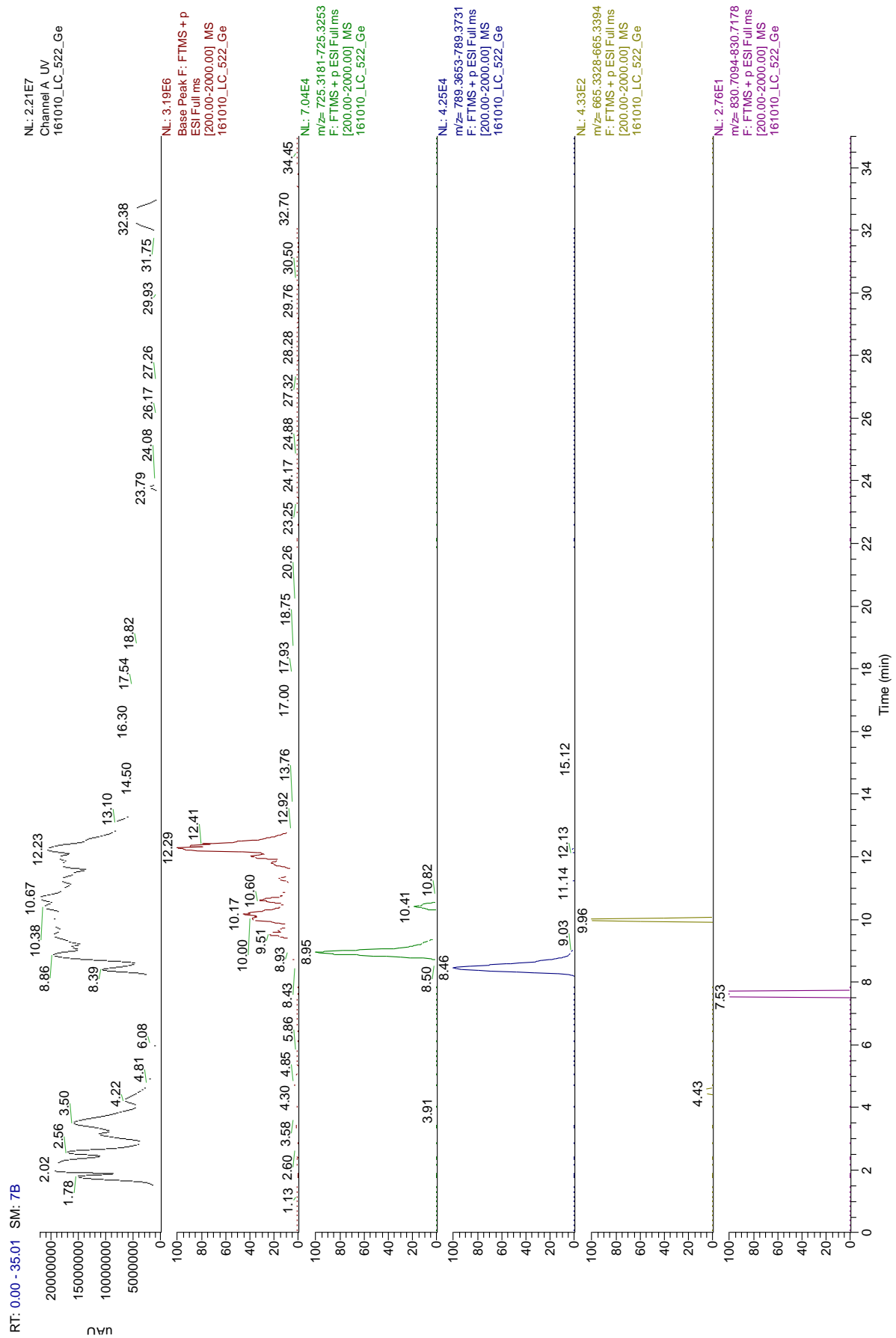
8.6 Massenspektren des Trypsinverdaus der Dimere 24d und 28d

Für den enzymatischen Verdau wurden wenige Mikrogramm der Peptiddimere wurden in $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer (50 mM, pH = 8.0) gelöst und ein Überschuss an Trypsin zugegeben. Nach 5 min bei 37 °C wurde der Verdau durch Addition von 2 μL Ameisensäure gestoppt. Die Lösung wurde direkt anschließend einer LC-MS-Messung unterzogen.

Mögliches Fragmentierungsmuster des Bidisulfid-Peptids **24d** (S5,S8) unter Bindungsbruch an Amidbindungen oder an Disulfidbrücken:

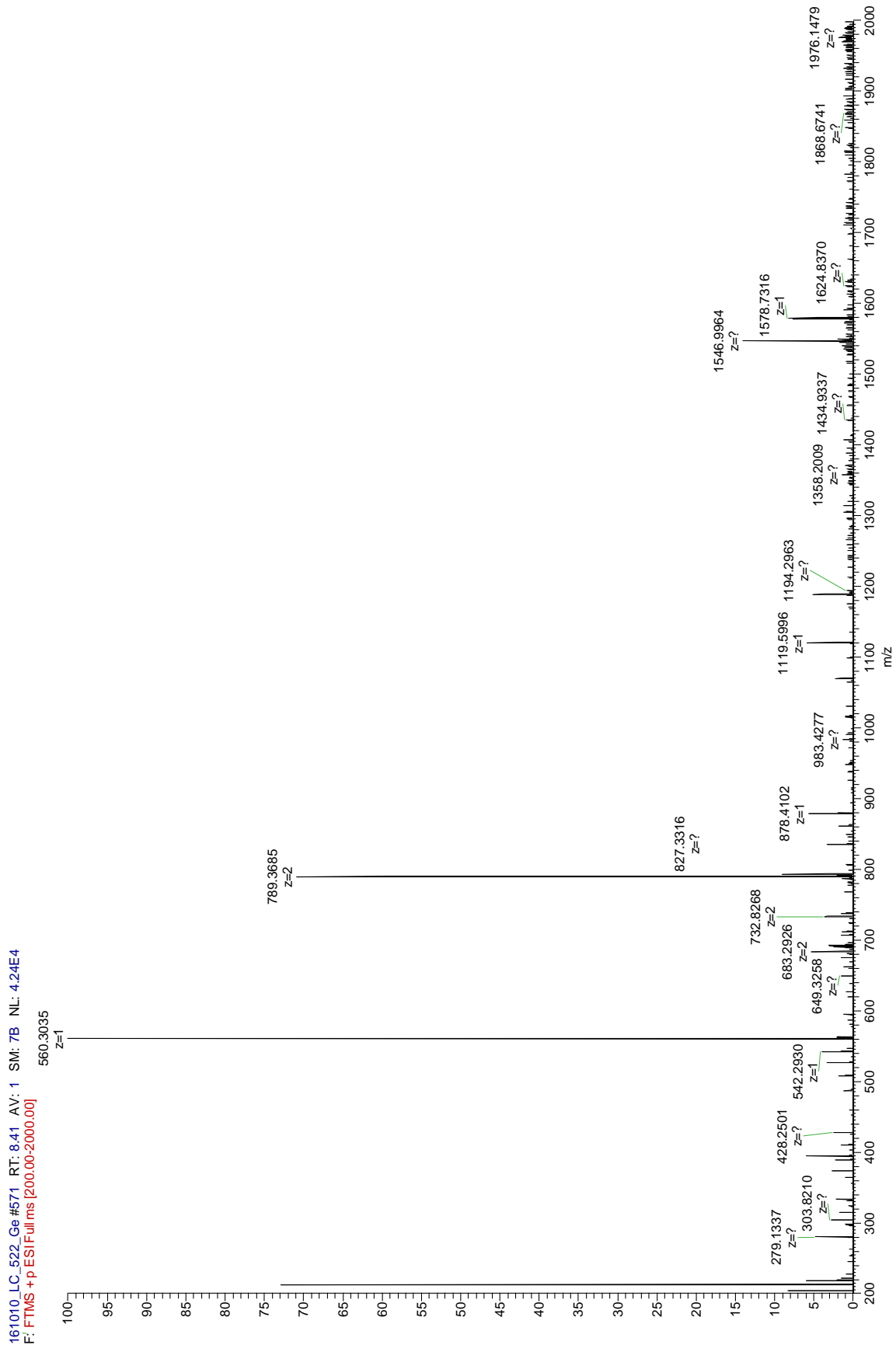


HPLC-Chromatogramme (UV-Vis- oder Massendetektion) des Trypsinverdaus von 24d

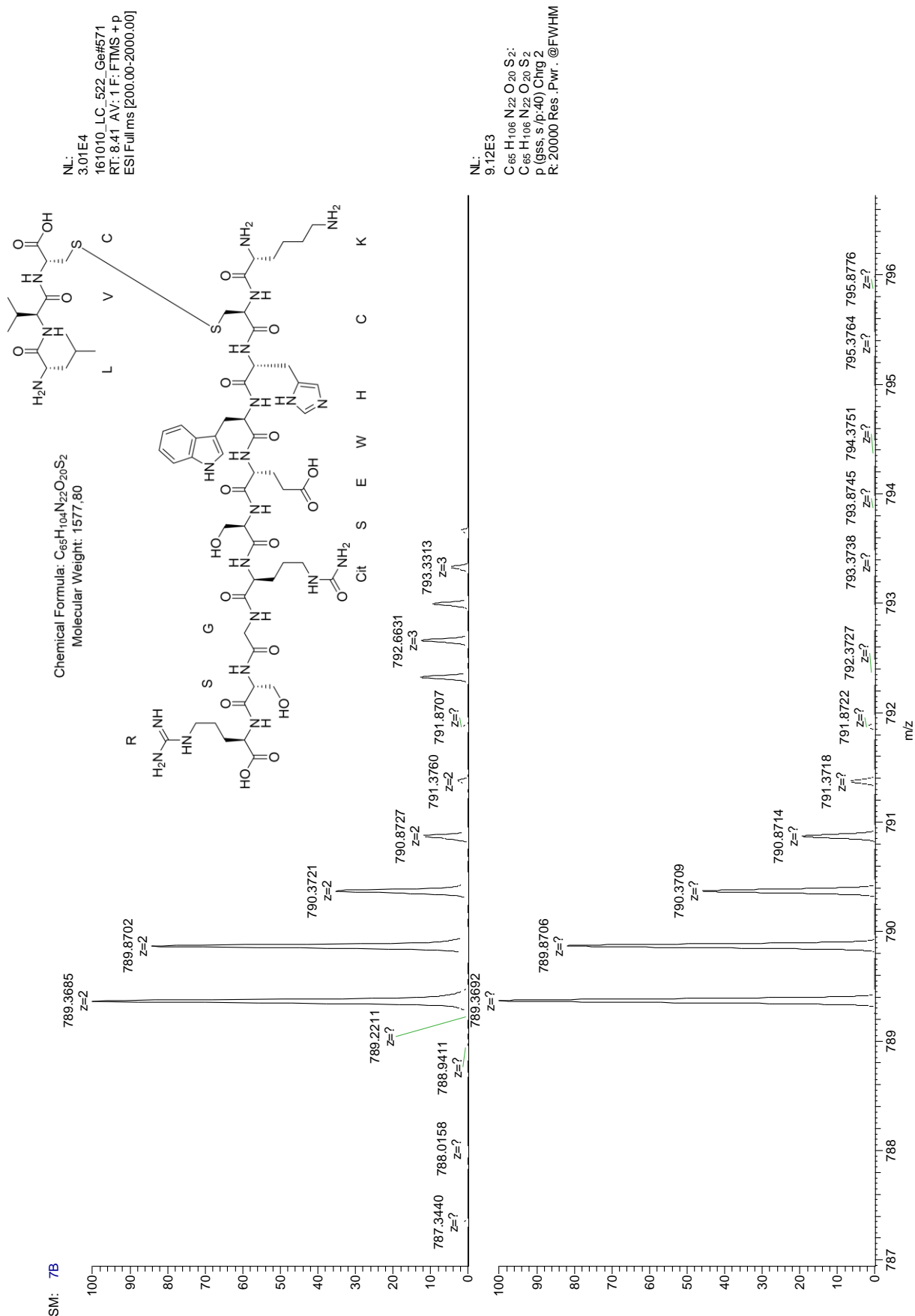


Übersichtsspektrum der detektierten Massen beim Trypsinverdau von 24d

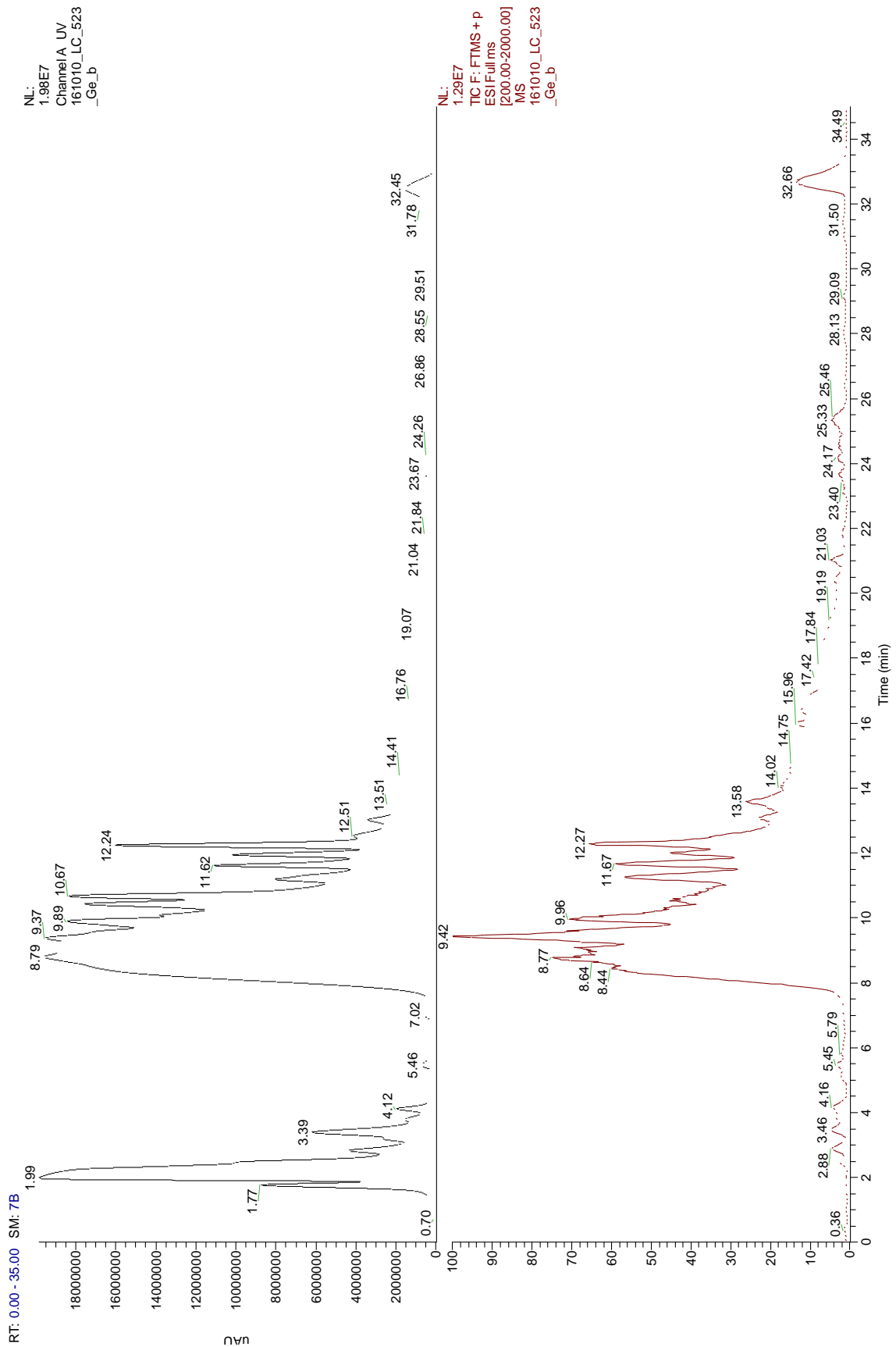
Es wurden keine intakten Dimere detektiert.



HR-Massenspektrum des angezeigten Fragments mit C1-C12'/C1'-C12-Verknüpfung

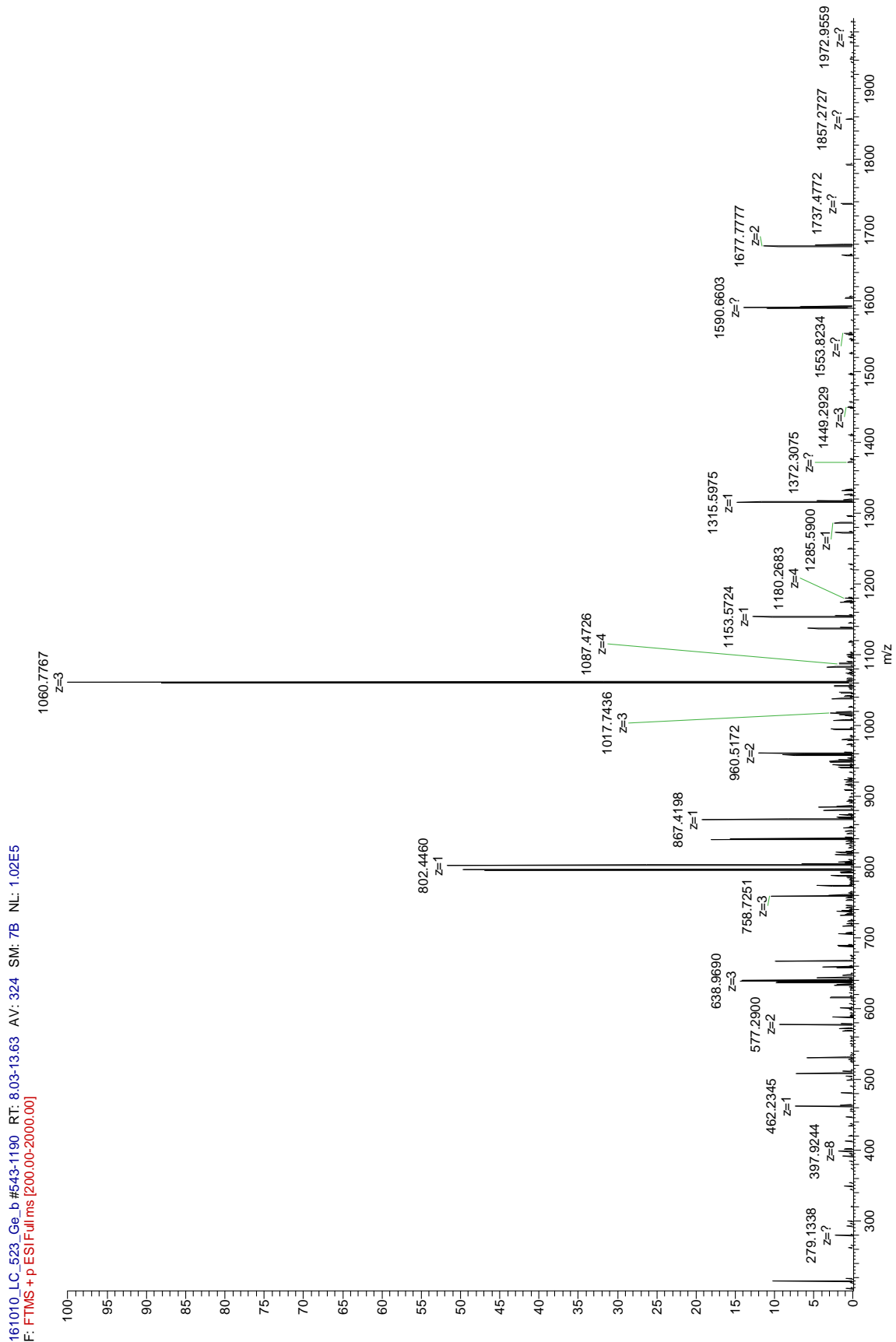


HPLC-Chromatogramme (UV-Vis- oder Massendetektion) des Trypsinverbaus von 28d



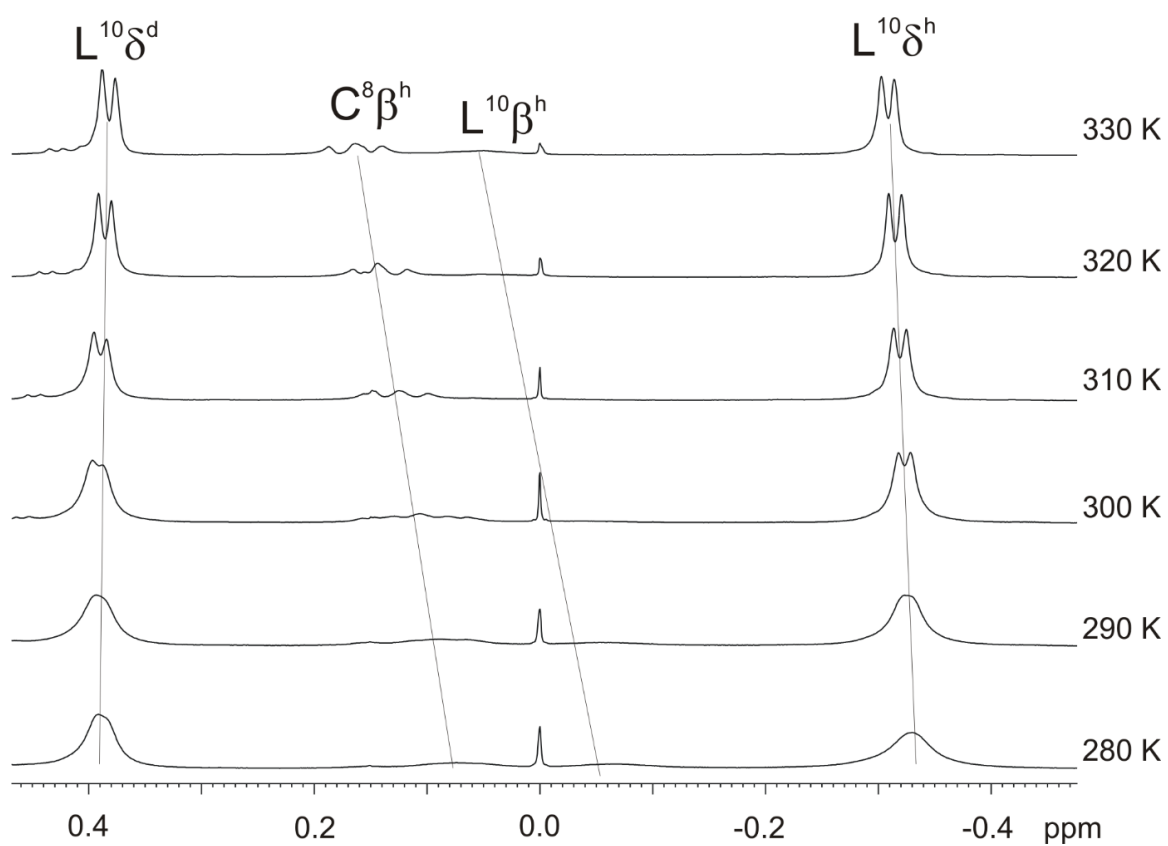
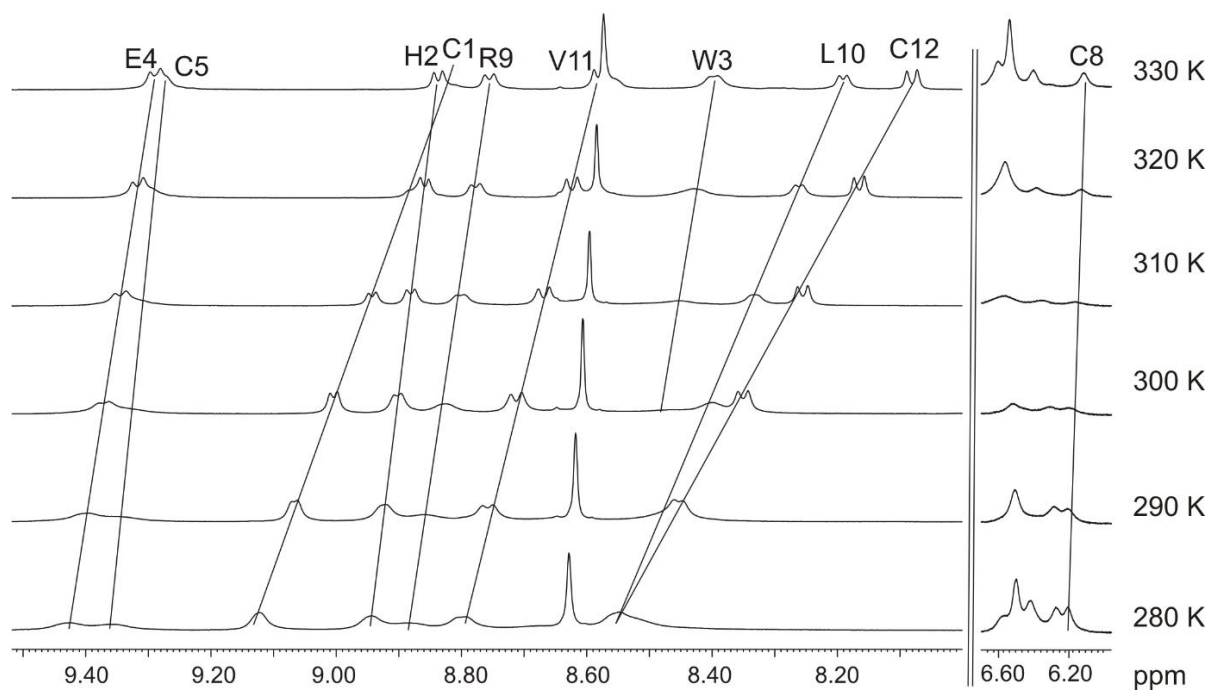
Übersichtsspektrum der detektierten Massen beim Trypsinverdau von 28d

Der Hauptpeak (1060.7767, $z = 3$) entspricht intakten Dimeren



8.7 NMR-Spektren des Tetradisulfids 28d

Temperaturreihen (600 MHz, 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 3.0)/D₂O 9:1)



8.8 Ionenmobilitätsspektrometrie der 12er-Monomere und -Dimere

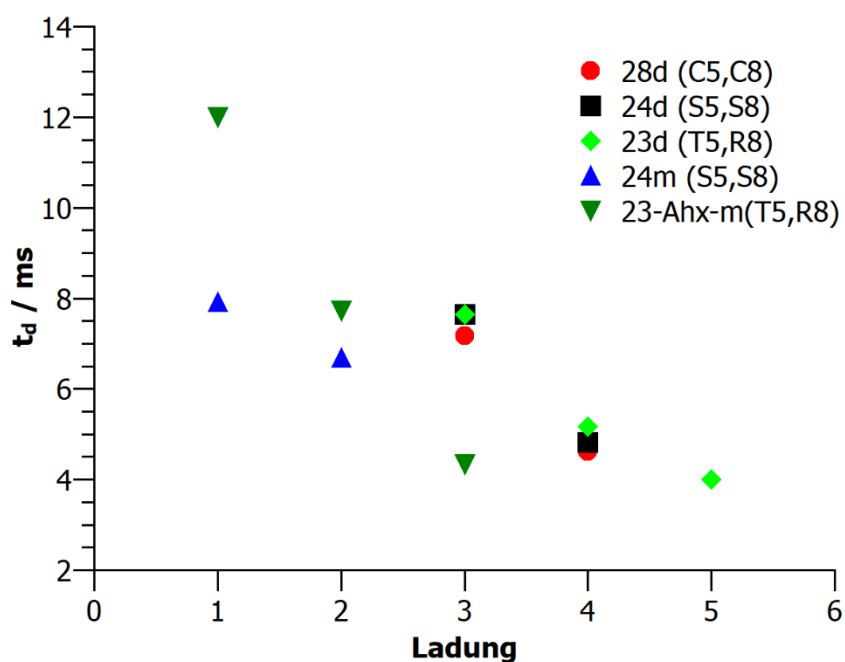
Erhaltene Driftzeiten der Peptide für verschiedene Ladungszustände z .

	Driftzeit/ms				
Peptid	$z = 1$	$z = 2$	$z = 3$	$z = 4$	$z = 5$
28d (C5,C8)	n/a	n/a	7.17	4.62	4.20
24d (S5,S8)	n/a	n/a	7.65	4.82	n/a
23d (T5,R8)	n/a	n/a	7.65	5.17	4.00
24m (S5,S8)	7.92	6.68	n/a	n/a	n/a
23-Ahx-m (T5,R8)	11.99	7.72	4.34	n/a	n/a

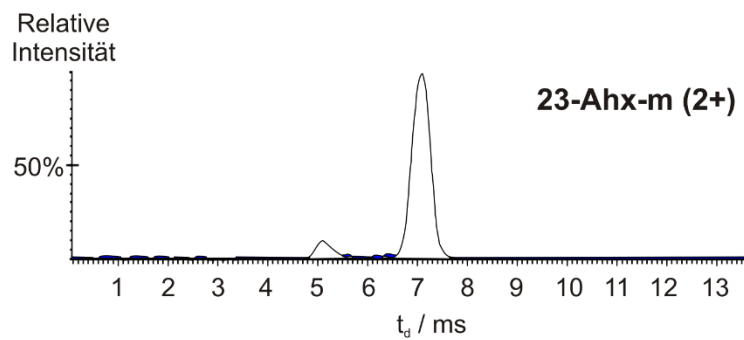
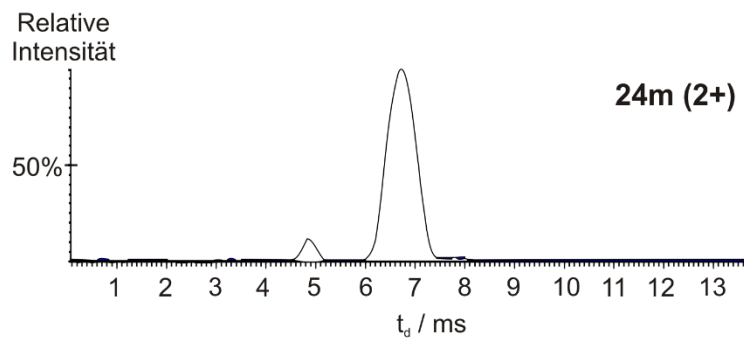
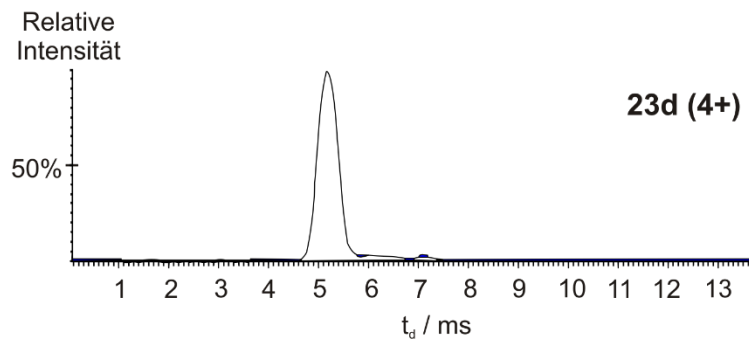
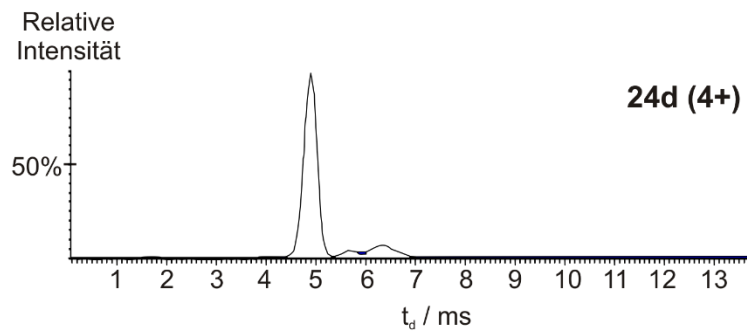
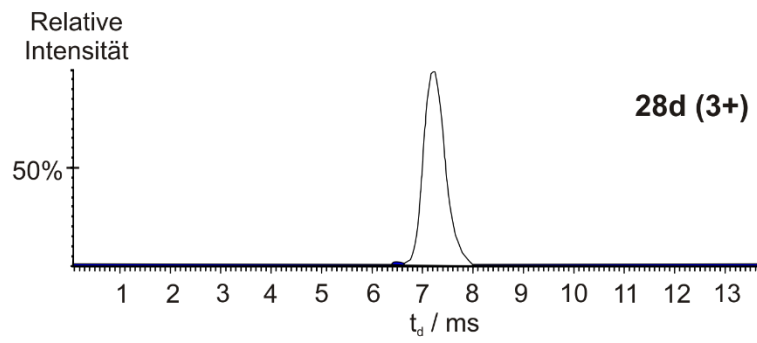
Aus den Driftzeiten errechnete Stoßquerschnitte (*collisional cross section*, CCS).

	CCS / Å ²				
Peptid	$z = 1$	$z = 2$	$z = 3$	$z = 4$	$z = 5$
28d (C5,C8)	n/a	n/a	644	685	n/a
24d (S5,S8)	n/a	n/a	667	703	n/a
23d (T5,R8)	n/a	n/a	669	727	797
24m (S5,S8)	228	418	n/a	n/a	n/a
23-Ahx-m (T5,R8)	281	449	503	n/a	n/a

Auftragung des Ladungszustandes z gegen die Driftzeit t_d .



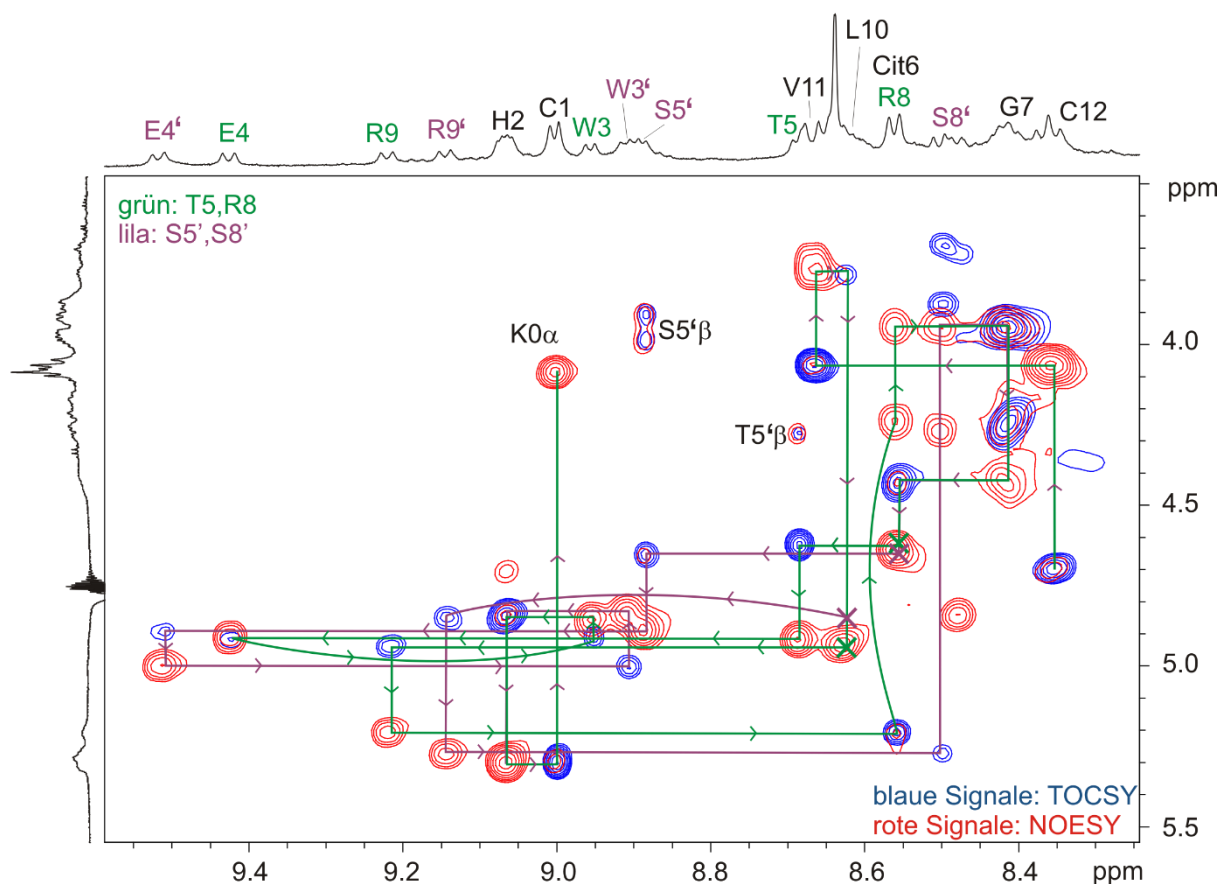
Ionenmobilitätsspektren



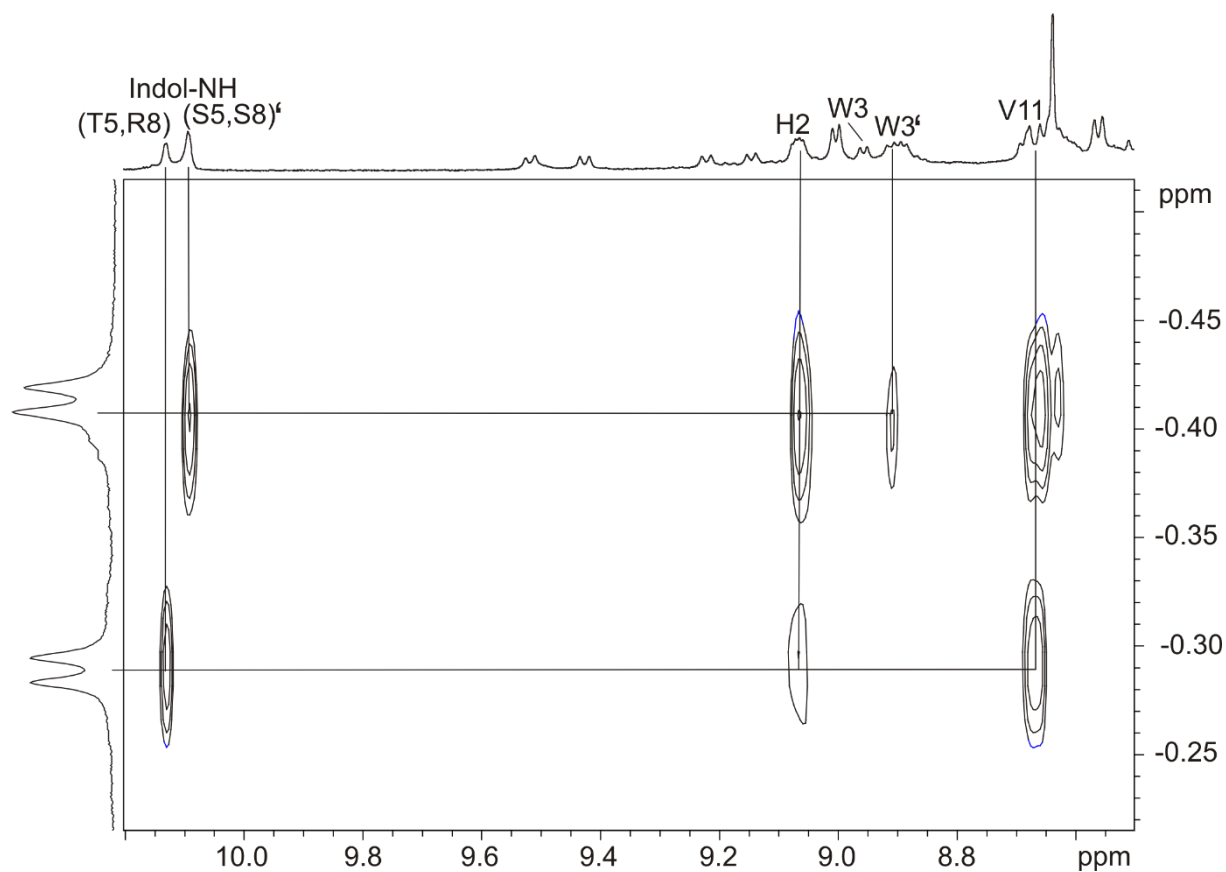
8.9 Sequential walk des Heterodimers 29d

Der *sequential walk* ermöglicht die Unterscheidung einiger amidischen Signale der Monomer-Untereinheiten des Heterodimers **29d** anhand der Verschiebungsunterschiede und Kopplungsmuster (auch im TOCSY innerhalb der Aminosäure-Spinsysteme). Dies betrifft die NH-Protonen von W3/W3', E4/E4', T5/S5', R8/S8' sowie R9/R9'. Entscheidend sind dabei die *sequential walk*-Abfolgen T5-E4-W3 bzw. S5'-E4'-W3', die in Bezug auf die genannten Kopplungsmuster und Verschiebungswerte eindeutig unterschieden werden können und somit unter Beweis stellen, dass diese Signale im Vergleich zu ihren jeweiligen Homodimeren vertauscht sind (siehe auch Kapitel 3.8.3).

Im Spektrenausschnitt (NH-H α -Bereich; 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1)) für den *sequential walk* sind das TOCSY- (blau) und NOESY-Spektrum (rot) übereinandergelegt. Die monomeren Untereinheiten sind farblich gekennzeichnet (grün: T5,R8; lila: S5',S8'). Liegen die amidischen Signale der Untereinheiten übereinander, so sind die Verbindungslinien grün, die Pfeilspitzen lila gezeichnet. Die Kontakte, an denen sich der *sequential walk* aufteilt, wurden mit Kreuzen markiert.

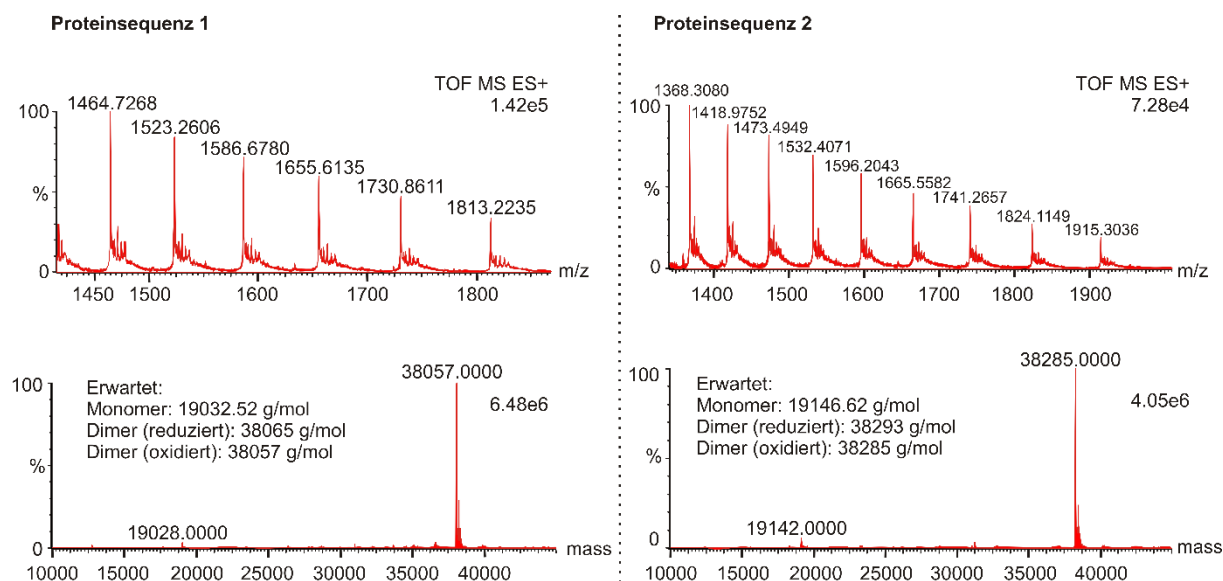


Gleiches gilt für die L10-H δ -Protonen sowie die Indol-NHs. Diese können über die NOE-Kontakte mit den im *sequential walk* ausgewerteten amidischen Signalen als auch durch ihre Kontakte untereinander eindeutig zugeordnet werden. Ein relevanter Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum ist unten abgebildet.

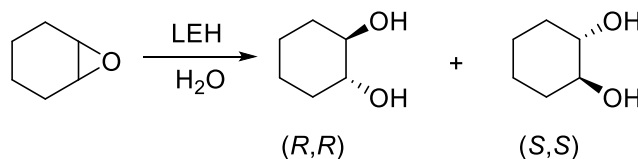


8.10 Analytische Daten der LEH-Mutanten 1 und 2

Massenspektren



Funktionsassays

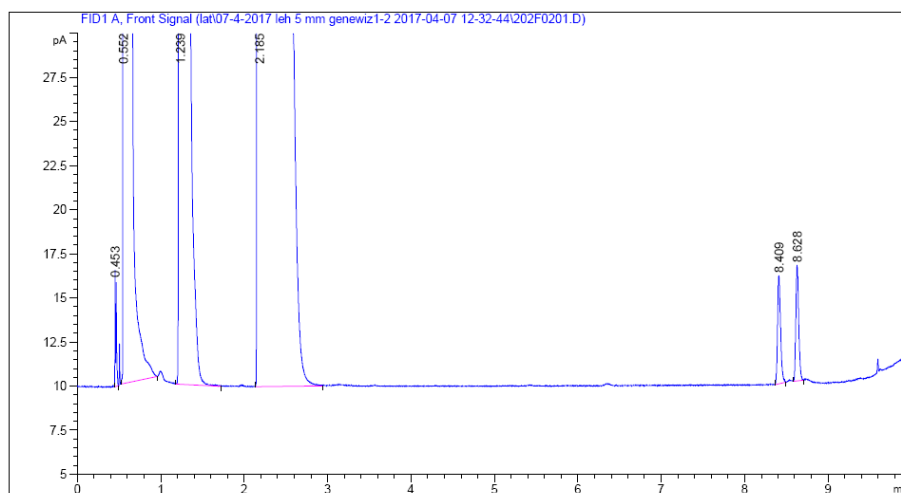


Die Messungen wurden von Dr. AITAO LI (Arbeitskreis REETZ) durchgeführt.

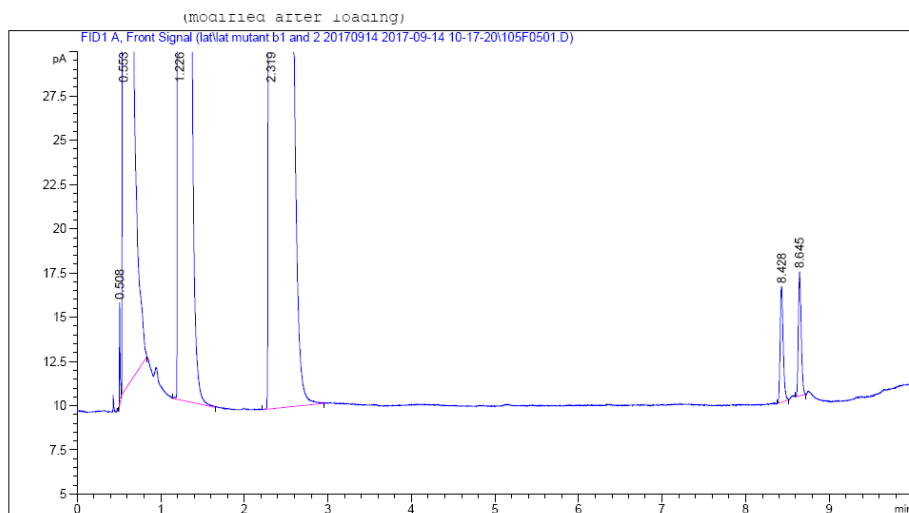
Die Reaktion wurde in 4 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 7.4, Kosolvens: 5% MeCN) mit einer Enzymkonzentration von 1 mg/mL und einer Substratkonzentration von 5 mM bei 30 °C, 200 UpM für 5 h durchgeführt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Reaktionsgemisch mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat extrahiert. Die erhaltene organische Phase wurde zentrifugiert und anschließend einer GC-Analyse unterzogen.

Die unten abgebildeten GC-Chromatogramme zeigen das (S,S)-Diol (linker Peak bei 8.09 min) und das (R,R)-Diol (rechter Peak bei 8.63 min) für den Wildtyp und die beiden *hinge*-Mutanten.

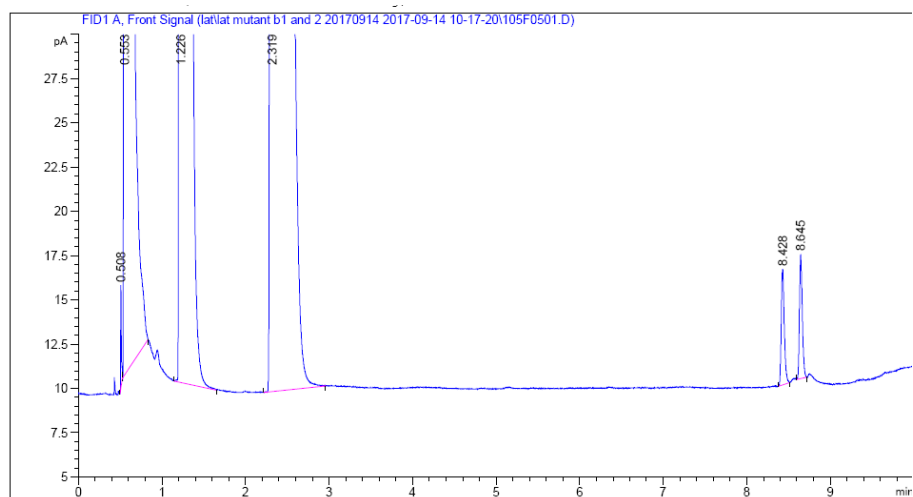
Wildtyp



LEH1



LEH2



8.11 Sequenzen der transfizierten Antikörper

mAb CL4

Leichte Kette:

METPAQLLFLLLLWLPVSDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWY
QQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNEWF
RTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC.

Schwere Kette (unmodifiziert):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYPMTWV
RQAPGKGLEWVASISYDGSYKYKVDSMKGRLTISRDN SKNTLYLEMNSLTAEDTAV
YYCARTAFFNAYDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLD SVGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK.

Schwere Kette (modifiziert mit antiparallelem *hinge*):

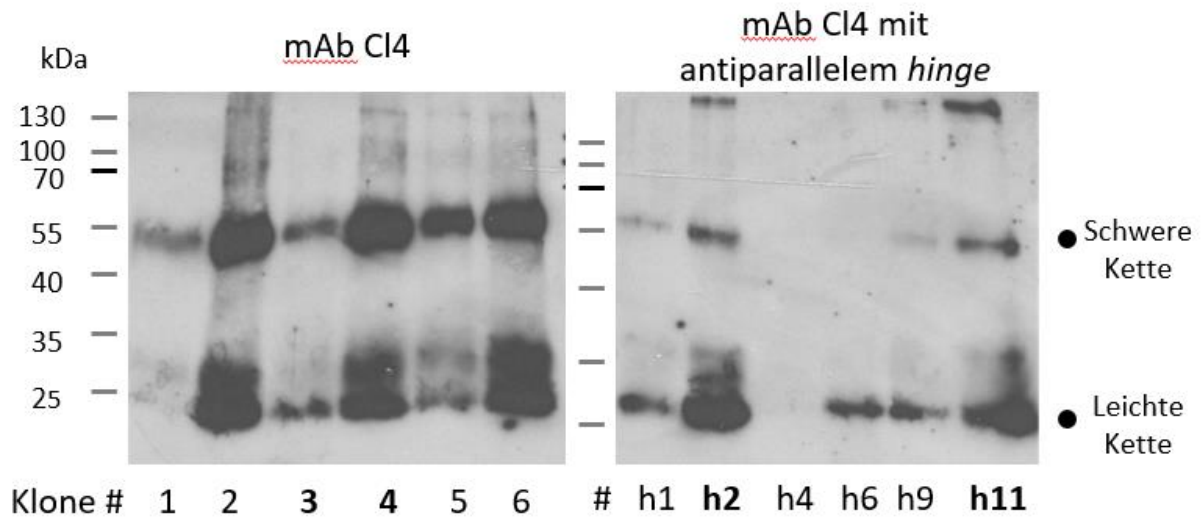
MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYPMTWV
RQAPGKGLEWVASISYDGSYKYKVDSMKGRLTISRDN SKNTLYLEMNSLTAEDTAV
YYCARTAFFNAYDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHT**KCHWECRGCR**LV**CK**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SVGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F
SCSVMHEALHNH**YTQKSLSLSPGK**.

8.12 Analytik des mAb Cl4-Antikörpers

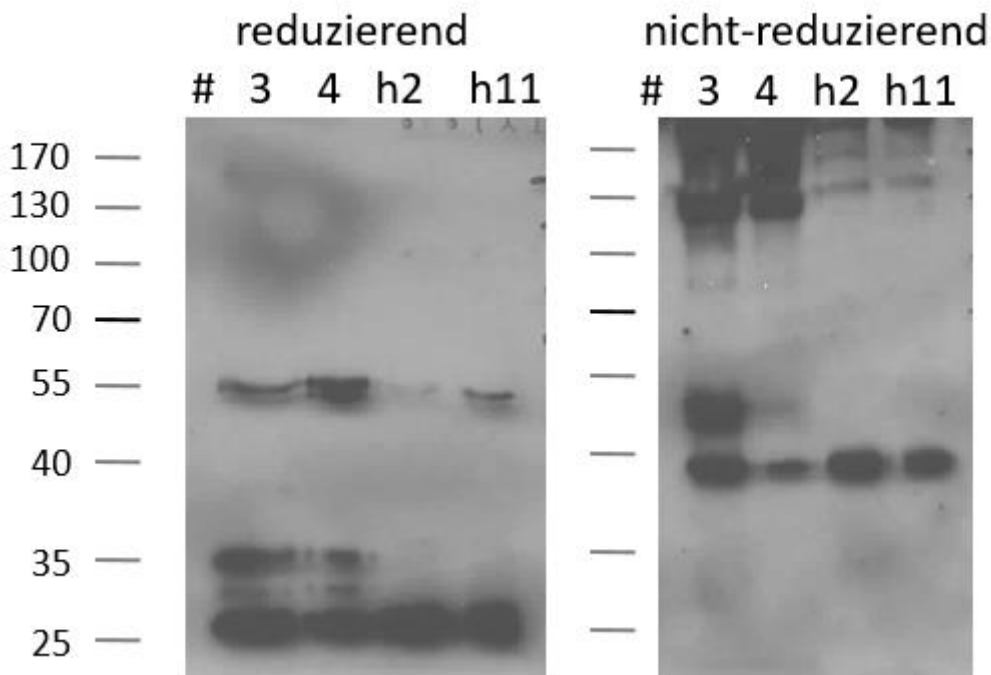
Western Blot unter reduzierenden Bedingungen

Die Messungen wurden von FRANZISKA HEMPEL (AK MAIER) durchgeführt.

Die Klon-Nummern entsprechen den Algenproben, in die die Plasmide mittels Genkanone eingebracht wurden. Die vielversprechendsten Proben wurden für weitergehende Tests (s.u.) ausgewählt).



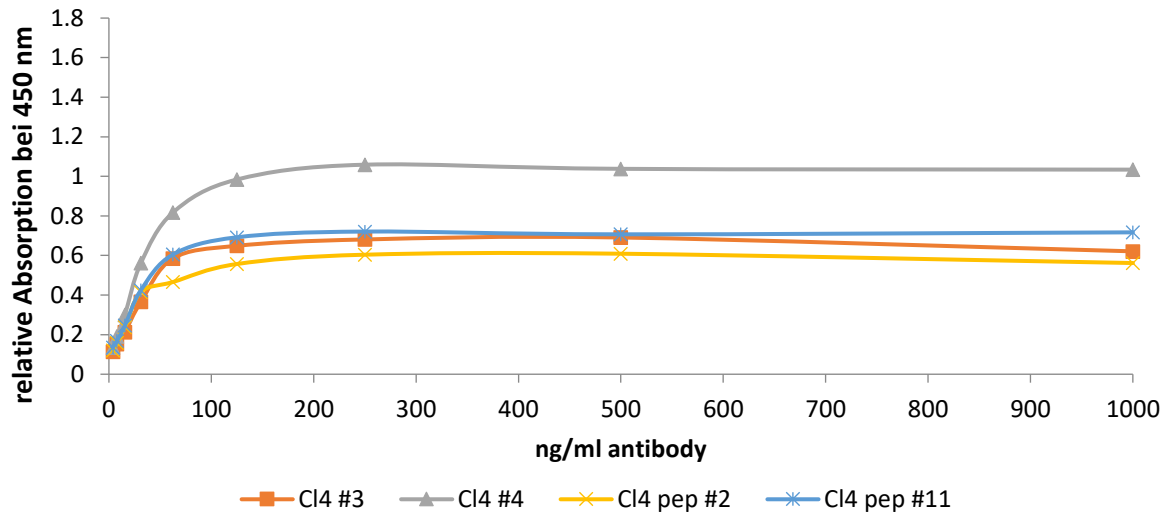
Western Blot unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen der Algenklone 3 und 4 sowie h2 und h11



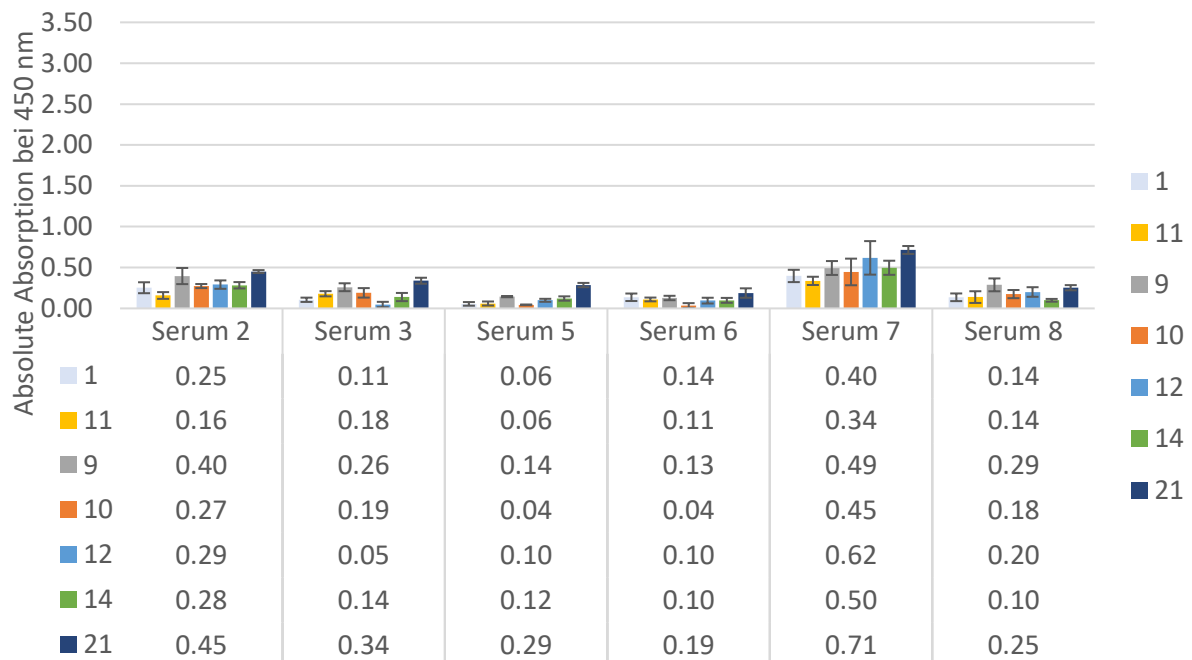
Ergebnisse der vorläufigen ELISA-Tests gegen das *hepatitis B virus surface antigen*

Die Messungen wurden von FRANZISKA HEMPEL (AK MAIER) durchgeführt.

Antikörper 3 (orange) und 4 (grau) entsprechen den Wildtypen, Antikörper pep2 (gelb) und pep 11 (blau) den *hinge*-mutierten Immunglobulinen.



8.13 ELISA-Tests der Kontrollgruppe



Abkürzungen

2CTC	2-Chlortritylchlorid
ACPA	engl. <i>anti-citrullinated peptide/protein antibody</i> (Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine)
aq.	wässrig
arom.	aromatisch
BPTI	engl. <i>bovine pancreas trypsin inhibitor</i> , pankreatischer Trypsin-Inhibitor
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CCP	cyclische citrullinierte Peptide
d	Dublett (NMR), Tage
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eq	Äquivalent
ESI	Elektronensprayionisation
<i>et al.</i>	lat. und Andere
EtOAc	Essigsäureethylester
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
gef.	gefunden
HR	engl. <i>high resolution</i> (Hochauflösung)
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase, ELISA)
HSQC	engl. <i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin der Klasse G, Gammaglobulin
IgM	Immunglobulin der Klasse M (M: μ heavy chain)
nJ	skalare Kopplung über n Bindungen
LEH	Limonen-1,2-Epoxid-Hydrolase
m	Multipllett (NMR)
MD	Moleküldynamik

MS	Massenspektrometrie
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NOE	engl. <i>nuclear overhauser effect</i> bzw. <i>enhancement</i>
NOESY	engl. <i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
Oxyrna	Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat
PAD	Peptidylarginin-Deiminase
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PDB	Protein-Datenbank
PG	engl. <i>protecting group</i> (Schutzgruppe)
PIFA	Phenyliod(III)bis(trifluoracetat)
q	Quartett (NMR)
RA	Rheumatoide Arthritis
rc	engl. <i>random coil</i>
RP	engl. <i>reversed phase</i> , Umkehrphase
RT	Raumtemperatur (ca. 20 °C)
s	Singulett (NMR)
Sa	SAVOIE, benannt nach dem ersten Patienten, bei dem die anti-Sa-Autoantikörper auftraten
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPPS	engl. <i>solid phase peptide synthesis</i> , Festphasenpeptidsynthese
t	Triplett (NMR)
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
Trt	Trityl
TSP _{d4}	Natrium-(trimethylsilyl)-propionat (deutert), interner Standard bei Messungen in wässriger Lösung ($\delta = 0.00$ ppm)
TOCSY	engl. <i>total correlation spectroscopy</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
WATERGATE	engl. <i>water suppression by gradient tailored excitation</i>
WB	Wasserstoffbrücke
δ	chemische Verschiebung (NMR)

Ein- und/oder Dreibuchstabencode der für die vorliegende Arbeit relevanten Aminosäuren. Große Buchstaben (Einbuchstabe oder erster Buchstabe des 3er-Codes) entsprechen der L-Konfiguration, kleine Buchstaben der D-Konfiguration der jeweiligen Aminosäure.

Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode	Aminosäure
Ahx		6-Aminohexansäure
Alb		Albizziin
Ala	A	Alanin
βAla	βA	β-Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Aub		2-Amino-4-ureidbuttersäure
Cit		Citrullin
Cys	C	Cystein
Dab		2,4-Diaminobuttersäure
Dap		2,3-Diaminopropionsäure
Dpg		3,5-Dihydroxyphenylglycin
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Hci		Homocitrullin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Mpg		4-Monohydroxyphenylglycin
Pro	P	Prolin
sDMA		symmetrisches Dimethyl- Arginin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin
Xaa		beliebige Aminosäure

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. ERIC MEGGERS danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. ROBERT BERGER danke ich für seine Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Ich danke dem *Fonds der Chemischen Industrie im Verband der Chemischen Industrie* für die finanzielle Unterstützung durch das Chemiefonds-Stipendium und die zugehörigen Drittmittel, die mir den Besuch von vielen, lehrreichen Symposien erlaubte.

DÖRTE BRÖDJE und Prof. Dr. Dr. PETRA PFEFFERLE danke ich für Ihren unermüdlichen Einsatz in der Medizin, der das Gelingen des Ethikantrags und die Blutserentests überhaupt erst ermöglicht hat.

Ich danke unseren Kooperationspartnern aus der Biologie, Prof. Dr. UWE MAIER und Dr. FRANZISKA HEMPEL, für die Durchführung der Transfektionen und interessante Diskussionen rund um das Thema Antikörper und Algen.

Prof. Dr. MANFRED REETZ und seinem Mitarbeiter Dr. AITAO LI danke ich für die Einführung in das spannende Forschungsgebiet des LEH-Enzyms und die damit verbundenen Durchführung von Experimenten.

Den Mitarbeitern der Massenspektrometrischen Abteilung, allen voran UWE LINNE, der immer mit einem offenen Ohr und guten Ideen zur Stelle war, danke ich für die Aufnahme der Massenspektren. TINA KRIEG danke ich für die Durchführung des tryptischen Verdaus von Peptiden samt LC-MS-Messung.

Den Mitarbeitern der NMR-Abteilung, Dr. XIULAN XIE, Dr. RONALD WAGNER, GERT HÄDE und CORNELIA MISCHÉ danke ich für die Messung der NMR-Spektren an den Hochfeldgeräten, die Möglichkeit der Selbstmessung am AV-600 sowie den Hilfestellungen bei technischen Störungen.

Ein besonderer Dank gilt unserer Chefin, SUSANNE SCHELLENBERG, bei der alle organisatorischen Fäden zusammenlaufen. Danke für die Geduld beim Ausfüllen diverser

Dokumente und beim Vergleichen von Kostenvoranschlägen sowie für die Gespräche bei den morgendlichen und mittäglichen Tee- und Kaffeerunden.

Dr. SABRINA FISCHER, meiner Vorgängerin auf dem wunderbaren Weg der Filaggrin-Peptide, danke ich für die fundierte Vorarbeit, die diese Promotion überhaupt erst ermöglicht hat.

Ich danke meinen Vertiefern LISA-MARIE JASPER, MAURICE SEBASTIANI, SEBASTIAN WEBER, MAX KIENEL, TANU JAIN und NORA MAHR (die außerdem ihre Bachelorarbeit unter meiner Betreuung erfolgreich abschließen konnte) für ihre Mitarbeit an und Motivation bei den nicht immer frustfreien Forschungsprojekten.

Für das Lesen meiner Doktorarbeit auf korrigierende Art und Weise bedanke ich mich bei MAXIMILIAN JUNG, ROMINA KIRSCHNER, CHRISTOPH PRIEM und JAN REUTZEL.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises GEYER möchte ich für die schönen gemeinsamen Jahre auf A6 und später im Neubau danken.

Dr. MARYNA ABACILAR, der guten (ukrainischen) Seele des Arbeitskreises, danke ich für ihre herzliche und offene Art. Seitdem du nicht mehr hier bist, hat der hygienische Zustand des Kaffeeraums deutlich nachgelassen.

Danken möchte ich Dr. CARSTEN AUDEL für seine immerwährende Hilfsbereitschaft (am gesamten Fachbereich), die interessanten Gespräche beim alltäglichen Kaffee und die ein oder andere Insiderinformation über die derzeitige Fachbereichspolitik.

FABIAN DAUS, dem selbstverschuldeten Nachfolger Marynas, Meister der molekularen Bionik und einem Kommilitonen der ersten Stunde hier in Marburg, danke ich für alle chemischen und weniger chemischen Gespräche. Viel Erfolg weiterhin bei deinem Techtelmechtel mit der Glücksfee!

Ich danke dem Imitationstalent PHILIP HORX für interessante Konversationen über Peptide, molekulares Modelling (bei dem es nichts Neues mehr geben wird) und alle anderen wichtigen Dinge des Lebens. Und falls es mal nicht so läuft: Nimm Flextape oder spiel eine Runde Nightshade!

MAXIMILIAN JUNG danke ich für seine herzliche Art und immerwährende Hilfsbereitschaft in allen Fragen des (Doktoranden-)Lebens. Die Konversationen über die Herausforderungen des Alltags im VW up! (mit dem du mich das ein oder andere Mal vor einer Übernachtung auf den Lahnbergen bewahrt hast) werde ich vermissen.

Bei ROMINA KIRSCHNER bedanke ich mich für ihr großes Talent, zuzuhören, ihre überragenden Koch- und Backkünste (überleg es dir noch einmal mit einem Berufswechsel!) und die Unterhaltungen auf höchstem Niveau über alle wichtigen und unwichtigen Themen dieser Welt.

Dr. MATTHIAS LAMPING danke ich für seine unkomplizierte Art und die schönen Zeiten im Kleinwalsertal sowie auf dem Jungchemikerforum in Münster.

Mein Dank gilt Dr. MATTHIAS KÖRLING, der mittlerweile hoffentlich wieder zum Prog zurückgefunden hat, für all seine aufopferungsvollen Dienste im Arbeitskreis. Vielen Dank für deine Freundschaft sowie die vielen fachlichen Ratschläge und Diskussionen, gerade in Bezug auf die *hairpins* dieser Welt. In Anlehnung an deine Doktorarbeit: Vielleicht können wir unsere gemeinsamen Ergebnisse ja doch noch in einem gemeinsamen Manuskript interpretieren.

MICHELLE KRÜGER danke ich für die gute Laune, die sie stets verbreitet, ihre offene und direkte Art sowie ihre herausragenden Qualitäten als Leiterprüferin.

Ich danke STEFAN LENZ, dem Liebhaber wahrhaft guter Musik, mit der wir unseren Auswertebereich in Stereosound beschallen konnten. Danke für das Ausrasten beim *Cockroach King*, die Zeitreisen bei *Visions* und dem fast täglichen Genuss der *Affinity*. Es war mir eine Freude, mit dir die wirklich wichtigen Dinge des Lebens zu klären, den Zen-Garten zu pflegen, Flurgönder zu essen und dabei exquisiten Filmhighlights zu frönen.

LENNART NICKE (auch in der französischen Aussprache ein Genuss) danke ich für die Bereitstellung des überlebenswichtigen, mittlerweile feinen und milden Kaffees in unserem Arbeitskreis. Danke auch für den täglichen Austausch über Sinn und Unsinn des Doktoranden-Daseins.

Ich danke CHRISTOPH PRIEM für interessante fachliche und außerfachliche Gespräche beim alltäglichen Kaffee. Lass mich wissen, ob du es mit deinem steten Quarkkonsum (plus Donut) in das Guinness-Buch der Rekorde geschafft hast!

Ich danke JAN REUTZEL, der hoffentlich auch weiterhin nach Rekorden der Festigkeit seiner molekularen Bretter strebt, für seine außerordentliche Gastfreundschaft in der Casa Reutzel und den zahllosen sinnvollen und sinnbefreiten Gesprächen. Danke für all die *memes* und Ausdrucke von wichtigen Dokumenten und Fotos („aus“).

Dr. ANDRÉ WUTTKE danke ich für die Konversationen über „Weisheiten und Klassiker“ aller Art, der intensiven Auseinandersetzung mit der HPLC samt Probenschleifenwechsel und die

zuverlässige Erstversorgung mit Kaffee. Vielleicht finden wir ja irgendwann heraus, was es mit den 16 *heatguns* pro Abzug auf sich hatte.

SEBASTIAN LIES gilt ein uneingeschränkter, progressiver Dank als langjähriger Freund und Prog. Die vielen Gespräche über alles Wichtige und Unwichtige auf diesem Planeten, die unzähligen Progsessions und alles Andere, was unsere Freundschaft ausmacht, sind ein großartiges Geschenk.

Ich danke der Gæng, zu der MONA WAGNER (unserer Sekretærin), FABIAN MÜLLER, HENRIK LÖW und NIS-JULIAN KNEUSELS gehören, für ihre immerwährende Freundschaft, unsere gemeinsame Zeit hier in Marburg und alles, was wir sonst noch zusammen erleben durften (und sicherlich auch noch in Zukunft erleben werden). Ihr bereichert mein Leben in jeglicher Hinsicht und ich möchte euch nicht mehr missen.

Ein kuschliges Dankeschön geht an MIRIAM, meinem lieben Schatz, der mir immer wieder zeigt, welche Dinge im Leben wirklich zählen. Deine Unterstützung und deine Geduld haben mir auf dem steinigen Promotionsweg sehr geholfen und ich bin wirklich froh, dass du ihn an meiner Seite gegangen bist.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand und den nötigen Rückhalt für mein Studium (auch in finanzieller Hinsicht) gab. Es ist gut zu wissen, dass ihr immer für mich da seid!

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Eigenständigkeitserklärung

Ich, Andreas Schrimpf, erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation

„Formstabile Peptidpitope für die personalisierte Diagnostik der rheumatoiden Arthritis“

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in vorliegender oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, 26.01.2018

Andreas Schrimpf